

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Efectos de la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D_3 en fibroblastos estromales de cáncer de colon

Gemma Ferrer Mayorga

Madrid, 2016

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Efectos de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 en fibroblastos estromales de cáncer colon

Gemma Ferrer Mayorga
Licenciada en Bioquímica

Directores de tesis:
Prof. Alberto Muñoz terol
Dra. María Jesús Larriba Muñoz

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAM
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM)
Madrid

Alberto Muñoz Terol, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid

María Jesús Larriba Muñoz, Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN que **Gemma Ferrer Mayorga**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) el trabajo de investigación titulado:

“Efectos de la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ en fibroblastos estromales de cáncer de colon”

El presente trabajo cumple todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor.

Madrid, 4 de Octubre de 2016

Prof. Alberto Muñoz Terol

Dra. María Jesús Larriba Muñoz



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Prof. Alberto Muñoz en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) y ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

A mis padres

A mi hermana

En primer lugar quiero agradecer al Prof. Alberto Muñoz, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por ser tan cercano, por las oportunidades y el apoyo que me ha dado durante este periodo.

A mi codirectora la Dra. María Jesús Larriba, por ser además compañera y amiga, por haberme enseñado a hacer buena ciencia, por su paciencia, su comprensión y por ayudarme a mantener el modo “zen” cuando era casi imposible para las dos.

Al Dr. Federico Rojo por los análisis de inmunohistoquímica en pacientes. Al Dr. Gonzalo Gómez y a David Pisano por los análisis bioinformáticos. Al Dr. Ramón Cantero y a sus residentes por las muestras de pacientes.

A la Dra. Victoria Sanz Moreno por aceptarme en su laboratorio y por su entusiasmo en todo lo que hice allí. A José y Cecilia por enseñarme y hacerme la estancia sencilla y agradable.

Al Dr. David Lyden por acogerme en su laboratorio y tener siempre buenas palabras para mí. Gracias al Dr. Hector Peinado por su apoyo durante la estancia, por enseñarme todo sobre exosomas y enseñarme a sobrevivir en un laboratorio grande. Gracias a Angela (la Mafia italiana) y Basant que me ayudaron tantísimo durante mi estancia.

Al Dr. Leandro Sastre por dejarnos utilizar tantas veces la lupa y hacerlo siempre con una sonrisa.

Gracias a la Dra. Susana Alemany, por cuidarme tanto durante el principio de mi época científica y ayudarme a continuar en ella.

Al laboratorio de Felix Bonilla, en especial a Cristina por su ayuda con los fibroblastos.

A los compañeros del 2.3.1., en especial a Fabio por sus historias y por esos detalles gluten free, y a Silvia por ser la primera en acogerme y enseñarme en el laboratorio. A Alba por acompañarme como predoc. A Graci, por esas conversaciones de psicología que tanto nos gustan y amenizan las tardes.

A José, por salvarme esos meses postbeca y ser siempre tan agradable. A Nuri, por acompañarme y por su apoyo durante el periodo de escritura.

A Olalla, por ayudarme tantísimo en el momento que más agobio tenía. A Javier (imagen) por su ayuda con las figuras. A Gutí y Alex por su ayuda con la informática.

A Isa y a Carlos aunque ahora estén triunfando en EEUU no me olvido de todo su apoyo.

A Olga y Omar, por acompañarme en esas largas tardes-noches en el IIB cuando ya no quedaba nadie, que siempre se hacían más amenas sabiendo que un “ligero” picoteo para cenar nos esperaba, por el apoyo en nuestros propósitos, por las risas y por todo lo demás.

A Elvira, por su sonrisa constante, su risa contagiosa y su buen humor constante. A Yuri y Carla, por escucharme y animarme. A la gente del laboratorio de Miguel Quintanilla, en especial a Patricia por compartir conmigo todos los momentos caóticos con los papeleos. A Mery, por aconsejarme durante todo este tiempo. A Alicia por acompañarme en las prácticas. A María y a Diego por amenizar las comidas con sus historias.

Gracias a los bioquímicos más majetes del mundo, Nuria, Chema y Helena, sois muy grandes.

Gracias a mis toronteros, Miguel (gracias por todo en NY) y Cristina, por esas cenas, bailes y momentos de risas y desconexión que se agradecen tantísimo.

Gracias, a mis bristóleras, son muchos años ya juntas, en especial a Marta y a Raquel, por vuestro apoyo, cariño, consejos y ánimo durante todo este tiempo, sois las mejores! A Luci, por transmitirme siempre esa tranquilidad y ese positivismo, y a Sandra que aunque se haya ido lejos, incluso desde la distancia tengo su apoyo. También, a Méndez por las risas y su interés por mi trabajo.

Gracias a Nisely y Vicente por su cariño y por el interés que han mostrado durante todo este tiempo.

Gracias a mi mejor amigo, por animarme, por su apoyo constante y cariño incondicional.

Gracias a mis padres y a mi hermana por su cariño y enseñarme tanto día a día. A mi padre por enseñarme a perseverar en aquello que quiero, a mi Madre por su apoyo incondicional en todo lo que hago y a mi sister por su bondad, su interés y entusiasmo, os lo debo todo a vosotros.

Gracias a Sergio, por acompañarme tantos fines de semana al laboratorio y hacerlo siempre con la mejor sonrisa, por su ayuda con las figuras, por su paciencia, por su cariño, por aguantarme, escucharme y apoyarme durante todo este tiempo.

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias de mayor incidencia y mortalidad. Estudios epidemiológicos indican que la deficiencia en vitamina D se asocia a un mayor riesgo de padecer CRC. De acuerdo con esto, la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), el metabolito más activo de la vitamina D, inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de células de CRC a través de su unión al receptor de vitamina D (VDR), un factor de transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares que regula la expresión de centenares de genes. VDR es el principal determinante de la sensibilidad celular a $1,25(OH)_2D_3$ y su expresión se pierde durante la tumorigénesis colónica, lo que generaría resistencia a una posible terapia con $1,25(OH)_2D_3$. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la relevancia del estroma tumoral en la progresión del cáncer. Los fibroblastos son el principal componente celular de dicho estroma y tras su activación por el microambiente tumoral contribuyen a la tumorigénesis por varios mecanismos. Sin embargo, los posibles efectos de la $1,25(OH)_2D_3$ sobre los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales no se conocen.

En esta Tesis Doctoral hemos establecido cultivos primarios de fibroblastos normales (NFs) y de fibroblastos asociados a tumores (CAFs) a partir de biopsias procedentes de pacientes con CRC, y hemos estudiado los efectos de la $1,25(OH)_2D_3$ sobre ellos. Los resultados muestran que los NFs y los CAFs de colon expresan VDR y responden a $1,25(OH)_2D_3$. La $1,25(OH)_2D_3$ inhibe en ellos dos propiedades protumorales características de los fibroblastos: la capacidad de contraer geles de colágeno y la de inducir la migración de las células de carcinoma. Asimismo, la $1,25(OH)_2D_3$ reduce las acciones protumorales de fibroblastos de otros orígenes. Los análisis de expresión génica global revelan que la $1,25(OH)_2D_3$ modula el patrón de expresión génica de NFs y CAFs, y nos han permitido caracterizar que la inhibición de la expresión de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 por $1,25(OH)_2D_3$ es necesaria para el efecto de ésta sobre la capacidad de los fibroblastos colónicos de contraer geles de colágeno. Por otro lado, hemos analizado la expresión de VDR y de las proteínas codificadas por los genes diana de $1,25(OH)_2D_3$ *CD82* y *S100A4* en tumores procedentes de una serie amplia de pacientes con CRC metastásico. Los resultados indican que una alta expresión de VDR en los fibroblastos estromales de dichos tumores correlaciona con una mayor supervivencia de los pacientes. Asimismo, la expresión de *CD82* y de *S100A4* en dichos fibroblastos se asocia con la de VDR y con el pronóstico clínico de los pacientes.

Los resultados obtenidos indican que la $1,25(OH)_2D_3$ ejerce su acción antitumoral en CRC actuando no solo sobre las células de carcinoma, sino también sobre los fibroblastos estromales y que, por tanto, el tratamiento de pacientes con CRC con $1,25(OH)_2D_3$ puede ser explorado incluso si las células de carcinoma carecen de expresión de VDR.

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent and lethal neoplasias. Epidemiological studies indicate that vitamin D deficiency is associated with a higher risk of CRC. In agreement with this, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), the most active metabolite of vitamin D, inhibits the proliferation and induces the differentiation of CRC cells by binding the vitamin D receptor (VDR), a transcription factor of the nuclear receptor superfamily that regulates the expression of hundreds of genes. VDR is the main determinant of cellular sensibility to $1,25(OH)_2D_3$ and its expression is lost during colon tumorigenesis, leading to resistance to $1,25(OH)_2D_3$. In recent years, the relevance of tumor stroma on cancer progression has emerged. Fibroblasts are the main cellular component of cancer stroma and upon activation by the tumor microenvironment they contribute to the tumorigenesis by several mechanisms. Despite all this, the possible effects of $1,25(OH)_2D_3$ on stromal fibroblasts of colorectal tumors are unknown.

In this Doctoral Thesis, we have established primary cultures of normal fibroblasts (NFs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) from CRC patient biopsies, and have studied the effects of $1,25(OH)_2D_3$ on them. The results show that colon NFs and CAFs express VDR and respond to $1,25(OH)_2D_3$. $1,25(OH)_2D_3$ inhibits two fibroblast protumoral characteristics in these cells: the capacity to contract collagen gels and to induce the migration of carcinoma cells. Likewise, $1,25(OH)_2D_3$ reduces the protumoral actions of fibroblasts from different origins. Global gene expression analyses show that $1,25(OH)_2D_3$ modulates the gene expression profile of NFs and CAFs, and have led us to characterize that the inhibition of the expression of the chemokines CCL2, CCL11 and CCL13 by $1,25(OH)_2D_3$ is required for $1,25(OH)_2D_3$ effect on the capacity to contract collagen gels of colonic fibroblasts. Moreover, we have analyzed the expression of VDR and of the proteins encoded by the $1,25(OH)_2D_3$ target genes *CD82* and *S100A4* in tumors from a large cohort of metastatic CRC patients. Our results indicate that high VDR expression in stromal fibroblasts correlates with longer patient survival. In addition, *CD82* and *S100A4* expression in those fibroblasts is associated with that of VDR and with clinical outcome of CRC patients.

Our results indicate that $1,25(OH)_2D_3$ exerts its antitumoral effects in CRC by acting not only on carcinoma cells, but also on stromal fibroblasts. Therefore, treatment of CRC patients with $1,25(OH)_2D_3$ should be explored even if carcinoma cells lack VDR expression.

Abreviaturas	1
Introducción	7
1. Vitamina D.....	9
1.1. Metabolismo de la vitamina D.....	9
1.2. Acciones biológicas de la 1,25(OH) ₂ D ₃	10
1.3. Mecanismo de acción de la 1,25(OH) ₂ D ₃	11
1.3.1. El receptor de vitamina D	11
1.3.2. Elementos de respuesta a vitamina D.....	12
1.3.3. Acciones genómicas de la 1,25(OH) ₂ D ₃	13
1.3.4. Acciones no genómicas de la 1,25(OH) ₂ D ₃	14
2. Cáncer colorrectal	15
2.1. Biología del epitelio intestinal.....	15
2.2. Origen y progresión de la neoplasia intestinal	16
3. Vitamina D y cáncer colorrectal.....	18
3.1. Expresión de VDR en cáncer colorrectal	19
3.2. Efectos antitumorales de la 1,25(OH) ₂ D ₃ en cáncer colorrectal	19
3.2.1. Proliferación	19
3.2.2. Diferenciación.....	20
3.2.3. Apoptosis.....	21
3.2.4. Antagonismo de la vía de señalización Wnt/β-catenina	21
3.2.5. Otros genes diana de 1,25(OH) ₂ D ₃ en células de CRC.....	22
4. Influencia de los fibroblastos asociados a tumores en la progresión tumoral	22
4.1. Características de los fibroblastos asociados a tumores	23
4.1.1. Marcadores de CAFs.....	23
4.1.2. Origen de los CAFs.....	24
4.1.3. Propiedades protumorales de los CAFs.....	25
4.2. Fibroblastos asociados a tumores en cáncer colorrectal.....	27
Objetivos.....	29
Materiales y Métodos	33
1. Muestras humanas	35

2. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos de colon humano	36
3. Cultivos celulares	37
4. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia en células en cultivo	37
5. Extracción de RNA y RT-qPCR	38
6. Análisis de la expresión de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	38
7. Ensayos de proliferación celular	39
8. Ensayos de contracción de geles de colágeno.....	40
9. Ensayos de migración e invasión celular	40
10. Análisis de la expresión génica global mediante <i>microarrays</i>	41
11. Inmunoquímica en tumores colorrectales humanos y análisis estadísticos asociados.....	41
12. Análisis del fenotipo de inestabilidad de microsatélites y de mutaciones de BRAF en tumores colorrectales humanos	42
13. Análisis estadísticos	43
Resultados.	45
1. Efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en fibroblastos de distintos orígenes.....	47
1.1. Fibroblastos de distintos orígenes expresan VDR y responden a 1,25(OH) ₂ D ₃	47
1.2. La 1,25(OH) ₂ D ₃ inhibe las acciones protumorales de fibroblastos de distintos orígenes.....	48
2. Efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal	51
2.1. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal	51
2.2. Los cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal expresan VDR y responden a 1,25(OH) ₂ D ₃	53
2.3. La 1,25(OH) ₂ D ₃ inhibe las acciones protumorales de los fibroblastos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal	55
2.4. Efecto de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sobre la expresión génica de fibroblastos normales y asociados a tumores procedentes de pacientes con cáncer colorrectal	59
2.5. La represión de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 es necesaria para el efecto inhibitorio de la 1,25(OH) ₂ D ₃ sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos de colon humano	72
3. Expresión de VDR y de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ CD82 y S100A4 en muestras de pacientes con cáncer colorrectal	75
3.1. Análisis de la especificidad del anticuerpo anti-VDR	75

3.2. VDR se expresa en las células de carcinoma y en el estroma de tumores colorrectales humanos	78
3.3. Altos niveles de expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral se asocian con un mejor pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal	79
3.4. La expresión de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ <i>CD82</i> y <i>S100A4</i> en los fibroblastos del estroma tumoral se asocia con la expresión de VDR en dichas células y con la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal.....	84
Discusión.....	87
1. Expresión de VDR en el estroma de los tumores colorrectales.....	89
2. VDR como factor pronóstico en cáncer colorrectal.....	91
3. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe las propiedades protumorales de los fibroblastos	93
4. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce una profunda regulación de la expresión génica en los NFs y CAFs derivados de pacientes con cáncer colorrectal	94
5. Papel de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 en la acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los fibroblastos colónicos	96
6. Comparación del patrón de expresión génica de NFs y CAFs y de su respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	97
7. La expresión de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ <i>CD82</i> y <i>S100A4</i> en el estroma tumoral se asocia con la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal.....	100
8. Expresión de VDR y efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en distintos tipos de fibroblastos	100
9. Implicaciones clínicas de la acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre los fibroblastos del estroma tumoral en cáncer colorrectal	102
Conclusiones.....	105
Bibliografía.	109
Anexo	127

1,25(OH)₂D₃: 1 α ,25-dihidroxitamina D₃

25(OH)D₃: 25-hidroxitamina D₃

5-FU: 5-Fluorouracilo

α -SMA: α -actina de músculo liso

ACFs: focos de criptas aberrantes

AF2: función de activación 2

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ANGPTL4: angiopoyetina-4

ATCC: *American Type Culture Collection*

BP: proceso biológico

BSA: albúmina de suero bovino

Ca²⁺: calcio

CAFs: fibroblastos asociados a tumores

CC: componente celular

ChIP-Seq: inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación masiva

CI: intervalo de confianza

CIN: inestabilidad cromosómica

CRC: cáncer colorrectal

CREBBP o CBP: proteína de unión a CREB

CSC: células troncales cancerosas

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo

DAVID: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*

DBD: dominio de unión al DNA

DBP: proteína de unión a vitamina D

DRIP205: proteína 205 de interacción con VDR

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

ECM: matriz extracelular

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EMT: transición epitelio-mesénquima

EMT-TFs: factores de transcripción inductores de EMT

EndMT: transición endotelio-mesénquima

FAP: poliposis adenomatosa familiar

FAP- α : proteína de activación de fibroblastos α

FBS: suero fetal bovino

FDR: *Benjamin & Hochberg False Discovery Rate*

FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos 2

FGM-2: *Fibroblast Growth Medium-2*

GO: ontología génica

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HNPCC: CRC hereditario no polipósico

HR: *Hazard ratio*

ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1

IGF: factor de crecimiento insulínico

IL: interleuquina

LBD: dominio de unión al ligando

LOX: lisil oxidasas

MF: función molecular

miRNAs o miRs: microRNAs

MMPs: metaloproteasas de ECM

MMR: sistema de reparación de apareamientos incorrectos

MSI: inestabilidad de microsatélites

MSK1: proteína quinasa activada por mitógenos y estrés 1

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

NCOAs: coactivadores de receptores nucleares

NCORs: correceptores de receptores nucleares

NFs: fibroblastos normales

NG2: antígeno neuro-glial 2

nVDREs: VDREs negativos

OCT: *Optimal Cutting Temperature*

OPN: Osteopontina

OS: supervivencia global

p38MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos p38

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR- β : receptor de PDGF de tipo β

PDPN: podoplanina

PFS: supervivencia libre de progresión

P_i: fosfato

PSCs: células estrelladas del páncreas

PTH: hormona paratiroidea

RECIST: Criterios para Evaluar Respuesta en Tumores Sólidos

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

ROCK: quinasa asociada a Rho

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RXR: receptor X de retinoides

SD: desviación estándar

SEM: error estándar de la media

SPARC: proteína secretada ácida y rica en cisteína

TF2B: factor de transcripción 2B

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TGFBR1: receptor de TGF- β tipo 1

UV-B: ultravioleta B

VCAM1: molécula de adhesión vascular 1

VDR: receptor de vitamina D

VDREs: elementos de respuesta a vitamina D

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

ZO: *zonula occludens*

1. Vitamina D

1.1. Metabolismo de la vitamina D

La vitamina D no es técnicamente una vitamina, sino una prohormona, ya que la mayor parte de la vitamina D presente en nuestro organismo se sintetiza en la piel y carece de actividad biológica hasta su activación metabólica [66, 154, 177]. Existen dos tipos de vitamina D: la vitamina D₃ (colecalciferol) y la vitamina D₂ (ergocalciferol) sintetizadas en animales y plantas, respectivamente. Su estructura es similar a la de las hormonas esteroideas clásicas, que derivan de una molécula de esterano. La vitamina D es un secosteroide, ya que uno de los anillos del esterano tiene un enlace carbono-carbono roto (entre el C-9 y el C-10 del anillo B) [154] (Figura 1A y B).

La vitamina D₃ se sintetiza cuando la luz solar incide sobre nuestra piel y la radiación ultravioleta B (UV-B, longitud de onda 290-315 nm) produce la fotólisis del 7-dehidrocolesterol generando previtamina D₃, un compuesto termodinámicamente inestable que se transforma rápidamente en vitamina D₃ [51, 66]. Esta síntesis produce más del 90% de la vitamina D₃ presente en nuestro organismo, mientras que sólo el 10% restante procede de la dieta [177, 231]. Los alimentos con mayor cantidad de vitamina D son los pescados azules (grasos) como las sardinas y el atún, el aceite de hígado de bacalao y las setas *shiitake* secadas al sol [51, 99].

La vitamina D₃ procedente de la síntesis en la piel o de la dieta es biológicamente inactiva y pasa al torrente sanguíneo donde se une a la proteína de unión a vitamina D (DBP) o, con menor afinidad, a la albúmina. Sólo una pequeña fracción (< 0,1%) de la vitamina D₃ circula libre. En el hígado tiene lugar la hidroxilación del C-25 de la vitamina D₃ por hidroxilasas mitocondriales y microsomales (CYP27A1 y CYP2R1, respectivamente) originándose la 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃, calcidiol), que tiene escasa actividad biológica (Figura 1C). La 25(OH)D₃ es la forma circulante de vitamina D₃ más abundante y se asocia también a la DBP. En el túbulo proximal del riñón, la 25(OH)D₃ se hidroxila en el C-1 del anillo A por la enzima CYP27B1 generándose la 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃, calcitriol), el metabolito más activo de la vitamina D₃ y responsable de sus acciones biológicas [51, 66, 231] (Figura 1B y C). CYP27B1 se expresa también en muchos otros tejidos (colon, cerebro, placenta, páncreas, nódulos linfáticos y piel), lo que permite la conversión local de la 25(OH)D₃ circulante a 1,25(OH)₂D₃ en los tejidos diana [51, 239].

El paso limitante en el catabolismo de la vitamina D₃ es la hidroxilación del C-24 de la 25(OH)D₃ y de la 1,25(OH)₂D₃ para dar lugar a los metabolitos menos activos 24,25(OH)₂D₃ y 1,24,25(OH)₃D₃, respectivamente, y está catalizada por la enzima mitocondrial CYP24A1 de expresión ubicua [51, 231, 248] (Figura 1C). La concentración sérica de 1,25(OH)₂D₃ se regula por varios mecanismos [51]. Por un lado, un incremento de 24,25(OH)₂D₃ o de la hormona paratiroidea (PTH) induce la síntesis renal

de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mientras que el aumento de calcio (Ca^{2+}), fosfato (P_i) o de la propia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ la suprime. Además, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la expresión de CYP24A1 lo que conlleva su catabolismo.

La mejor forma de analizar el estado vitamínico D de un individuo es medir la concentración sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (rango nM y vida media de 2-3 semanas), ya que la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y su vida media son mucho menores (rango pM y vida media de 5-15 horas), lo que dificulta su detección [223].

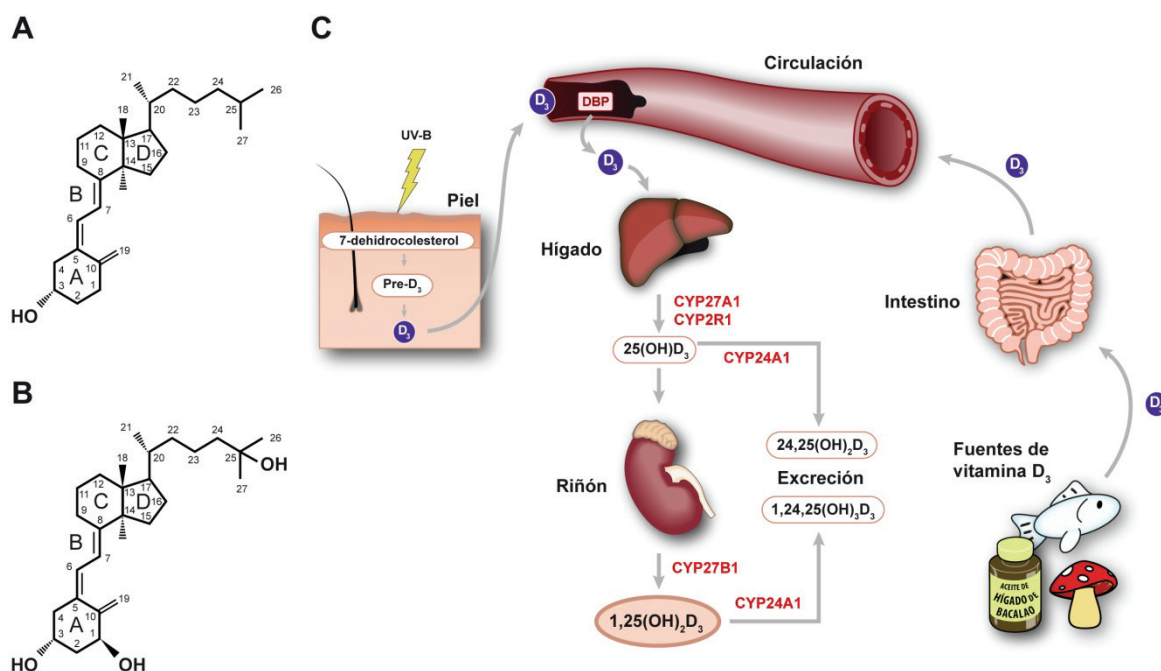


Figura 1. Metabolismo de la vitamina D. La vitamina D es un secosteroide con el anillo B del esterano roto entre C-9 y C-10. (A) Estructura de la vitamina D_3 . (B) Estructura de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (C) La vitamina D_3 se sintetiza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol o en menor proporción se obtiene de la dieta, pasa la torrente sanguíneo unida principalmente a la proteína DBP, y en el hígado se hidroxila por las enzimas CYP27A1 o CYP2R1 obteniéndose $25(\text{OH})\text{D}_3$. La $25(\text{OH})\text{D}_3$ es transportada al riñón donde tiene lugar su hidroxilación por la enzima CYP27B1 y se genera $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, el metabolito más activo de la vitamina D_3 . La enzima CYP24A1 de expresión ubicua cataboliza la conversión de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los metabolitos menos activos $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, respectivamente.

1.2. Acciones biológicas de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es una hormona pleiotrópica. Sus acciones más conocidas son la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} y el P_i y el control de la remodelación y mineralización de los huesos [27, 51]. La hipocalcemia induce la secreción de PTH por la glándula paratiroidea que actúa sobre el riñón disminuyendo la excreción de Ca^{2+} y la reabsorción de P_i , y estimulando la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [99, 250]. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a su vez aumenta el transporte activo de Ca^{2+} y P_i en el intestino delgado, y estimula e inhibe la reabsorción renal de Ca^{2+} y P_i , respectivamente. Por otro lado, la PTH y la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inducen en osteoblastos la expresión de factores osteoclastogénicos que actúan sobre los preosteoclastos promoviendo su maduración, lo que conlleva la destrucción de la matriz ósea, favoreciendo el aumento de los niveles de Ca^{2+} y P_i en sangre [42, 99, 179, 250]. Además, la

1,25(OH)₂D₃ suprime la mineralización ósea por un aumento en los niveles de expresión de la pirofosfatasa y de la osteopontina (dos potentes inhibidores de la mineralización ósea) [42]. En condiciones homeostáticas de Ca²⁺ normal o positivo, la absorción de Ca²⁺ intestinal promovida por la 1,25(OH)₂D₃ proporciona suficiente Ca²⁺ para una adecuada mineralización del hueso [42]. De acuerdo con esto, la deficiencia de 1,25(OH)₂D₃ produce raquitismo en niños y osteomalacia en adultos y aumenta el riesgo de fracturas óseas [42, 99].

El descubrimiento en 1981 de que la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la proliferación de células de melanoma y promueve la diferenciación de células de leucemia mieloide disparó el interés en la 1,25(OH)₂D₃ como agente anticanceroso [1, 36]. Desde entonces, numerosos estudios han mostrado que la 1,25(OH)₂D₃ tiene propiedades antiproliferativas, proapoptóticas, prodiferenciadoras, antimigratorias, antiinvasivas y antiangiogénicas en células derivadas de diferentes neoplasias [42, 136, 177]. La administración repetida de dosis elevadas de 1,25(OH)₂D₃ a pacientes con cáncer fue inicialmente restringida por los posibles problemas de toxicidad (hipercalcemia), lo que favoreció el desarrollo de análogos (deltanoides) que mantienen sus acciones antitumorales pero tienen un menor efecto hipercalcémico, de los cuales hay varios ya aprobados para su uso en humanos [53]. Actualmente hay numerosos ensayos clínicos que emplean la 1,25(OH)₂D₃ o alguno de sus análogos, solos o en combinación con otras drogas antitumorales, para el tratamiento de diferentes neoplasias (www.clinicaltrials.gov). Los escasos estudios clínicos finalizados no son concluyentes, en gran parte por su deficiente diseño, y es necesario disponer de los resultados de nuevos y mejores ensayos clínicos para establecer la posible utilidad de la 1,25(OH)₂D₃ y sus derivados en la terapia del cáncer [124, 223].

1.3. Mecanismo de acción de la 1,25(OH)₂D₃

1.3.1. El receptor de vitamina D

Las acciones biológicas de la 1,25(OH)₂D₃ están mediadas por su receptor: el receptor de vitamina D (VDR) [42]. VDR es un factor de transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares que regula la expresión de genes de forma dependiente de ligando [51]. La afinidad del monómero de VDR por sus sitios de unión en las regiones reguladoras de sus genes diana es baja, y para su unión específica al DNA se asocia a otro miembro de la misma superfamilia, el receptor X de retinoides (RXR), formando el heterodímero VDR-RXR [16, 29, 42, 86, 177].

Los receptores nucleares se caracterizan por tener un dominio de unión al DNA (DBD) altamente conservado cerca de su región NH₂-terminal y un dominio más variable de unión al ligando (LBD) o dominio de heterodimerización en la región COOH-terminal, ambos conectados por una región bisagra (*hinge*) [86, 179] (**Figura 2**). El DBD está compuesto por 2 dedos de zinc ricos en cisteínas,

mientras que el LBD consiste en un motivo de tipo sándwich compuesto por 12 hélices α (de H1 a H12; esta última constituye el dominio de la función de activación 2 o AF2) y 3 láminas β , en el caso de VDR [16] (**Figura 2**). Los aminoácidos contenidos en las hélices α forman un bolsillo dinámico de unión al ligando. La ocupación del bolsillo por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ da lugar a la formación de dos superficies de interacción estabilizadas por la región bisagra. Una de las superficies (formada principalmente por H9 y H10 y el bucle formado entre H8 y H9) facilita la interacción con RXR, mientras que la otra superficie (porciones de H3, H5 y H12) es esencial para el reclutamiento de complejos correguladores fundamentales para la modulación de la expresión génica [42, 85, 87, 179].

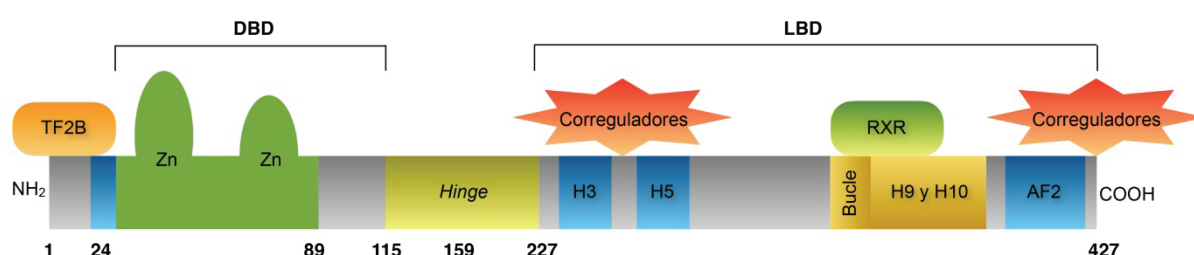


Figura 2. Representación esquemática de VDR. VDR está formado por un dominio de unión al DNA (DBD) compuesto por 2 dedos de zinc y un dominio de unión al ligando (LBD) compuesto por 12 hélices α (H1-H12) y 3 láminas β . Ambos dominios están unidos por la región bisagra (*hinge*).

Una proporción mayoritaria (80-90%), variable según el tipo celular, de VDR se localiza en el núcleo de la célula, y otra menor (10-20%) en el citosol. También se ha propuesto la presencia de VDR asociado a la membrana plasmática, e incluso la existencia de receptores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ distintos a VDR [51], aunque ninguna de estas hipótesis está ampliamente aceptada en el campo.

1.3.2. Elementos de respuesta a vitamina D

El heterodímero VDR-RXR se une, a través de los respectivos DBD, a secuencias específicas de nucleótidos dispersas en el genoma denominadas elementos de respuesta a vitamina D (VDREs) [28, 29]. Los VDREs clásicos están formados por la repetición directa de dos hexanucleótidos separados por 3 o 4 nucleótidos (AGTTCA n nnAGTTCA; siendo “n” cualquier nucleótido, denominados DR3 y DR4, respectivamente) o por dos repeticiones evertidas separadas por 6 ó 9 nucleótidos (TGAAC n nnnnnnAGTTCA; denominados ER6 y ER9, respectivamente), siendo los DR3 los más comunes [29, 87]. Al igual que otros miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, VDR es capaz de unirse a sus dianas genómicas en ausencia de ligando [29]. Varios estudios de inmunoprecipitación de cromatina y posterior secuenciación masiva (ChIP-Seq) han identificado cientos de sitios de unión de VDR en el genoma humano, que llegan a ser miles tras el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [29, 89, 188]. Los sitios de unión de VDR se localizan en zonas distantes y cercanas de los sitios de inicio de la transcripción, en intrones y en secuencias repetidas. La situación más común es la de un gen diana con múltiples sitios de unión de VDR en sus distintas regiones

reguladoras, aunque también hay parejas de genes diana cercanos que comparten uno o más sitios de unión de VDR, o incluso grupos de genes diana que contienen 5 ó 6 sitios de unión de VDR con diferentes características [27, 29]. También se ha descrito que después de la activación por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ una porción de moléculas de VDR cambia de regiones genómicas no-DR3 a secuencias DR3 [29, 179], pudiendo servir las primeras como “almacén” nuclear de VDR para ser utilizado rápidamente en presencia de ligando [29].

1.3.3. Acciones genómicas de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

El modelo más aceptado actualmente establece que en ausencia de ligando el heterodímero VDR-RXR está unido a VDREs presentes en las regiones reguladoras de sus genes diana e interacciona con diferentes correpresores transcripcionales, como los correpresores de receptores nucleares 1 y 2 (NCOR1 y NCOR2), que reclutan complejos con actividad histona deacetilasa y mantienen la cromatina en un estado transcripcionalmente reprimido (**Figura 3**) [51, 52, 179]. La unión de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produce la estabilización de VDR al fosforilarse en la serina 51 del DBD por la proteína quinasa C y en la serina 208 de la región bisagra por la caseína quinasa II [51, 85]. Además, se ha propuesto que VDR unido a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ interacciona con mayor afinidad con RXR a través de los dominios de dimerización [87]. La unión de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a VDR produce cambios conformacionales en VDR que conllevan la liberación de los correpresores y modulan la posición de la H12 llevándola a una posición “cerrada” o “activada” que actúa como una plataforma de unión para coactivadores transcripcionales como los coactivadores de receptores nucleares 1, 2 y 3 (NCOA1, NCOA2 y NCOA3), la proteína de unión a CREB (CREBBP o CBP) y la histona acetiltransferasa P300, así como para el complejo remodelador de la cromatina PBAF. Estos complejos median conjuntamente la acetilación de histonas y la apertura de la cromatina [42, 51]. A continuación, la proteína 205 de interacción con VDR (DRIP205) se une al dominio AF2 de VDR y atrae el complejo Mediador/DRIP/TRIP que contiene otras proteínas DRIP y actúa como puente con componentes de la maquinaria basal de transcripción, como el factor de transcripción 2B (TF2B) y la RNA polimerasa II, iniciándose así la transcripción de los genes diana [51, 52, 177] (**Figura 3**).

El mecanismo por el cual la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reprime la expresión de genes es menos conocido. Se ha descrito que la represión de *PTH* y *CYP27B1* por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ está mediada por la unión de VDR a VDRE negativos (nVDREs) similares a VDRE-DR3 pero cuya secuencia repetida es una caja E (CANNTG), estacionándose VDR en la mitad 5' del nVDRE en el caso del gen *PTH* humano [51]. En esta localización VDR podría ser más propenso a la modificación por proteínas fosfatasas que por proteínas quinasas favoreciendo la atracción de correpresores transcripcionales y dando lugar a la represión de los genes diana.

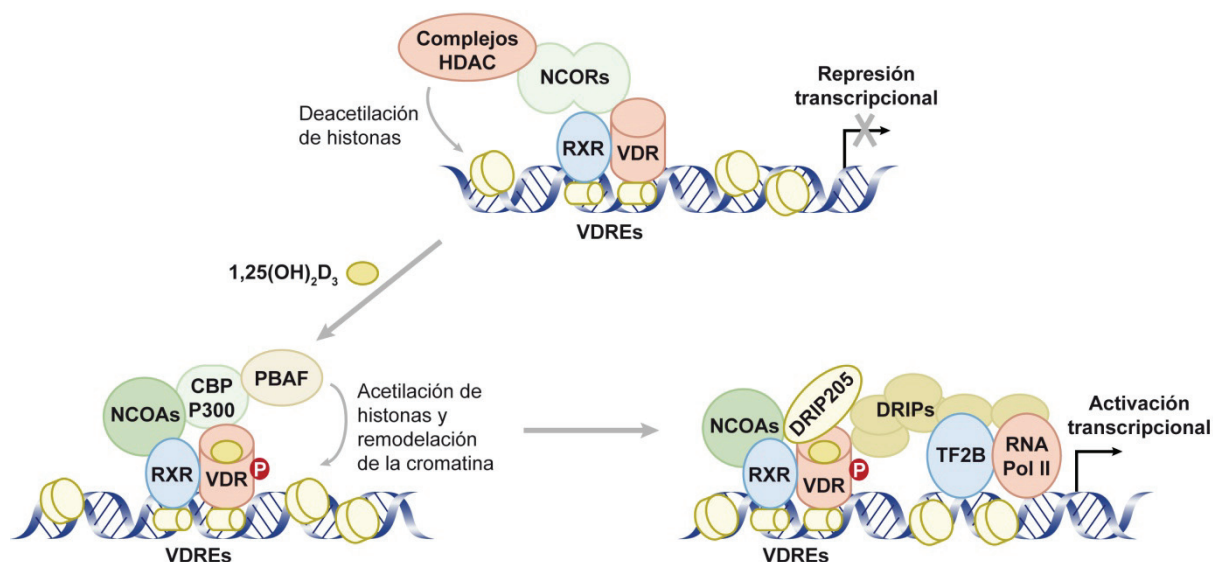


Figura 3. Regulación de la transcripción génica por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En ausencia de ligando el heterodímero VDR-RXR está unido a VDREs en las regiones reguladoras de los genes diana y a diferentes correpresores transcripcionales como NCOR1 y NCOR2 que reclutan complejos con actividad histona deacetilasa para mantener la cromatina en un estado transcripcionalmente inactivo. La unión de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a VDR libera los correpresores y promueve la unión de coactivadores transcripcionales como NCOA1, NCOA2, NCOA3, CBP, la histona acetiltransferasa P300 y el complejo remodelador de la cromatina PBAF que conjuntamente median la apertura de la cromatina. A continuación, se une DRIP205 y el complejo Mediator/DRIP/TRIP que contiene otras proteínas DRIPs y atrae al factor de transcripción TF2B y a la RNA polimerasa II para el inicio de la transcripción.

Este mecanismo de represión permite la retroregulación de la síntesis de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la regulación negativa de otros genes con nVDREs en sus promotores [51, 86, 177]. En otros casos, la represión génica por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ está mediada de forma indirecta por otros factores de transcripción o por microRNAs (miRNAs o miRs) [5, 42, 66, 77, 119, 170].

1.3.4. Acciones no genómicas de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Se han descrito acciones de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ independientes de la transcripción génica que se denominan “acciones no genómicas” y que incluyen la regulación de la apertura de canales iónicos o de la actividad de distintas enzimas (quinasas, fosfatasa, fosfolipasas, etc) [51]. Estas acciones suelen ser rápidas, pudiendo tener lugar en segundos o hasta en una hora, mientras que las respuestas genómicas generalmente necesitan varias horas o días para manifestarse completamente y pueden ser bloqueadas por inhibidores de la transcripción y de la traducción [51, 85]. Aunque las acciones no genómicas son independientes de la transcripción génica, pueden indirectamente afectar a ésta a través de la interacción con otras vías de señalización. Así, en células de cáncer de colon la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo elevando su concentración en el citoplasma, lo que conlleva la activación transitoria de la GTPasa de pequeño tamaño RhoA y de su efector la quinasa asociada a Rho (ROCK). A continuación, se produce la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK), que a su vez activa a la proteína quinasa activada

por mitógenos y estrés 1 (MSK1), siendo la activación de esta ruta de señalización necesaria para la regulación génica por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Así, VDR se requiere para la activación temprana de la cascada de señalización extranuclear y para la regulación transcripcional más tardía de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, teniendo una acción dual como factor de transcripción y como activador no genómico de RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK1 [161, 162, 164].

2. Cáncer colorrectal

2.1. Biología del epitelio intestinal

La función principal del tracto intestinal es la digestión, absorción de nutrientes y eliminación de residuos de la digestión. El intestino está anatómicamente dividido en intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso o colon [244], y es un tubo compuesto por tres capas. La capa más externa contiene numerosas láminas de músculo liso innervado y es la responsable de la peristalsis, la intermedia es la submucosa y está formada por tejido conjuntivo o estromal, y la más cercana a la luz del tubo, denominada mucosa, está constituida por células epiteliales cúbicas que procesan y absorben los nutrientes [203]. La superficie absorptiva del intestino aumenta drásticamente por numerosas protrusiones luminales denominadas vellosidades (sólo en el intestino delgado), y por invaginaciones hacia la submucosa llamadas criptas de Lieberkühn [203].

El epitelio intestinal está constituido por dos linajes de células diferenciadas: los enterocitos o linaje absorptivo, y el linaje secretor formado por las células caliciformes, las células enteroendocrinas y las células de Paneth (éstas últimas sólo en el intestino delgado) (**Figura 4**) [186]. Los enterocitos constituyen más del 80% de las células epiteliales intestinales. Son células muy polarizadas con un borde en cepillo (microvellosidades) en el polo apical y responsables de secretar hidrolasas y de la absorción y el transporte de nutrientes [186, 244]. Las células caliciformes secretan mucinas y otras proteínas necesarias para el movimiento y efectiva expulsión de los contenidos del intestino y para la protección frente al movimiento de cizalla y el daño químico [244]. Las células enteroendocrinas coordinan el funcionamiento del intestino secretando hormonas (serotonina, sustancia P y secretina) [38, 244]. Las células de Paneth residen en la base de las criptas del intestino delgado. Poseen una región apical alargada con gránulos que contienen péptidos antibacterianos como las criptidinas y lisozimas para controlar el contenido microbiano del intestino [38, 186]. Recientemente se han descrito otros tipos celulares menos abundantes del epitelio intestinal: las células Tuft, las células M y las células Cup [35, 76, 84, 158].

Todos estos tipos de células diferenciadas se generan a partir de las células troncales del epitelio intestinal que están situadas en la base de las criptas, y que por divisiones celulares originan progenitores proliferativos, denominados *transit-amplifying cells*. Estas células proliferan y migran

hacia la parte superior de la cripta intestinal, y tras 3 ó 4 divisiones paran su ciclo celular y se diferencian a los distintos linajes de células diferenciadas [219]. Aproximadamente 3 días después de la diferenciación terminal, las células alcanzan la superficie del epitelio experimentando una apoptosis espontánea, siendo liberadas al lumen intestinal [203]. Bajo las células epiteliales de la cripta y separados de éstas por una membrana basal existe una envoltura de fibroblastos especializados denominados fibroblastos pericriptales [186].

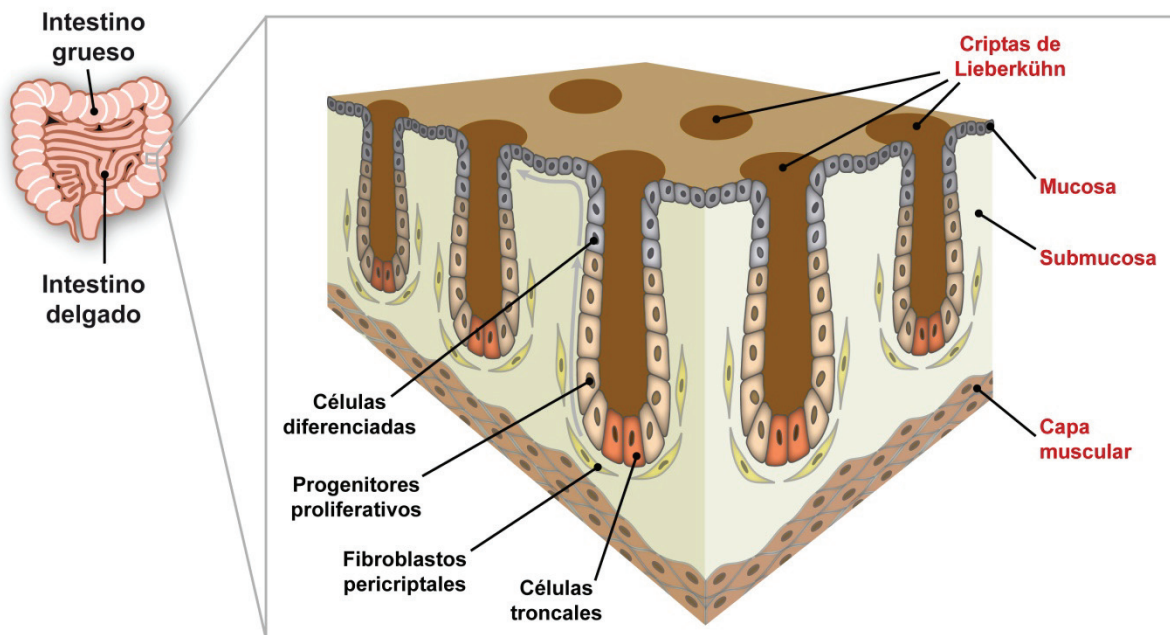


Figura 4. Estructura del epitelio intestinal. La superficie del intestino grueso está formada por invaginaciones hacia la submucosa llamadas criptas de Lieberkühn. En la base de las criptas residen las células troncales a partir de las cuales se originan los progenitores proliferativos que proliferan y migran hacia la parte superior de la cripta donde paran su proliferación para diferenciarse a las diferentes células diferenciadas.

2.2. Origen y progresión de la neoplasia intestinal

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial [236], siendo más del 90% de los casos de tipo esporádico [112]. El CRC hereditario incluye principalmente la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el CRC hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch, que están causados por la herencia de un alelo mutado del gen supresor de tumores *APC* (FAP) o de alguno de los genes implicados en el sistema de reparación de errores replicativos (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*; HNPCC).

En los años 90, Fearon y Vogelstein desarrollaron un modelo de evolución clonal del CRC que consiste en una secuencia lineal adenoma-carcinoma y propusieron que: 1) los tumores colorrectales ocurren como resultado de la activación mutacional de oncogenes acoplada a la inactivación de genes supresores de tumores; 2) son necesarias mutaciones en muchos genes para producir carcinomas; y 3) las alteraciones genéticas ocurren en una secuencia preferente, aunque es la

acumulación de cambios y no el orden de los mismos lo que determina las características histopatológicas y clínicas del tumor [63] (Figura 5).

La primera lesión identificable en el CRC son los focos de criptas aberrantes (ACFs) [155, 203]. Se han postulado varios modelos sobre el origen y crecimiento de las ACFs. Volgestein y colaboradores sostienen que las células mutantes de la superficie del epitelio del colon se expanden lateralmente y hacia abajo para formar nuevas criptas, lo que se conoce como el modelo apico-basal [212]. Por otro lado, Wright y colaboradores proponen que los adenomas crecen de forma baso-apical [181]. Recientemente se ha sugerido que ambos modelos no son excluyentes, sino dependientes de la intensidad de la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina [207]. Otro modelo aúna el modelo de evolución clonal de Fearon y Volgestein con la teoría de las células troncales cancerosas (CSC), población de células tumorales con propiedades de células troncales (autorrenovación y potencial de multidiferenciación) responsables de la iniciación y progresión del cáncer [249]. Este modelo postula que la primera mutación ocurre en las células troncales del epitelio colónico o en su progenie, y mutaciones sucesivas en una de esas células generan un clon más maligno e invasivo y con mayor capacidad metastásica dentro del tumor primario. Además, subclones independientes genéticamente diferentes pueden coexistir dentro del tumor [34].

Se han descrito dos rutas principales responsables del origen y progresión del CRC. La ruta supresora, que se asocia a inestabilidad cromosómica (CIN) y es responsable de la FAP y del 80% de los CRC esporádicos; y la ruta mutadora, que produce inestabilidad de microsatélites (MSI) y se observa en el HNPCC y en el 20% restante de CRC esporádicos [191, 203].

En la ruta supresora, las mutaciones iniciadoras del proceso conllevan la activación aberrante de la vía de señalización Wnt/ β -catenina [33, 112]. Así, en más del 80% de los CRC que siguen esta ruta, la tumorigénesis se inicia por mutaciones en el gen supresor de tumores *APC*, que impiden su interacción con las proteínas AXIN1 y AXIN2 y la formación del complejo de destrucción de β -catenina, lo que produce la acumulación y el paso de β -catenina al núcleo, su unión a factores de transcripción de la familia TCF/LEF y la activación de la transcripción de genes implicados en proliferación, migración, compromiso de linaje y diferenciación, promoviendo la formación de un adenoma [112]. En los casos en los que no está mutado *APC*, se observan mutaciones de *AXIN2* que también impiden la formación del complejo de destrucción o mutaciones de la propia β -catenina (codificada por el gen *CTNNB1*) que impiden su fosforilación y degradación por el proteasoma [112, 187, 191], conllevando también en ambos casos la activación de sus genes diana. También se han identificado, aunque con menor frecuencia, mutaciones en otros genes de la ruta como *RSPO2*, *RSPO3*, *ZNRF3*, *RNF43* y *TCF7L2/TCF4* [106]. El hecho de que la mayoría de los adenomas colónicos presenten mutaciones en componentes de la ruta Wnt/ β -catenina ha llevado a considerar la activación de dicha ruta como un evento clave e iniciador de esta tumorigénesis.

Para progresar a carcinoma, los adenomas deben acumular otras alteraciones. Así, muchos adenomas portan también mutaciones activadoras del oncogen *KRAS* o, alternativamente, de *BRAF* o *PIK3CA* [62, 191]. Además, la adquisición de mutaciones inactivadoras de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; principalmente en *SMAD4*, aunque también en *TGFBR2*) y de rutas que controlan la degradación de proteínas (*FBXW7*), la sobreexpresión de genes implicados en proliferación celular (*MYC*, *EGFR*), y la represión de marcadores de diferenciación epitelial (*CDH1*/E-cadherina), junto con alteraciones epigenéticas confieren características malignas adicionales a los adenomas [62, 203]. La inactivación del gen *TP53* se observa en el 50% de los tumores de colon y causa modificaciones extra como consecuencia de daños no reparados en el DNA y de la consiguiente inestabilidad genética [191, 203]. La acumulación de estas alteraciones conlleva la progresión de adenoma a carcinoma *in situ*, que posteriormente puede evolucionar a carcinoma invasivo y generar metástasis [63, 71] (Figura 5).

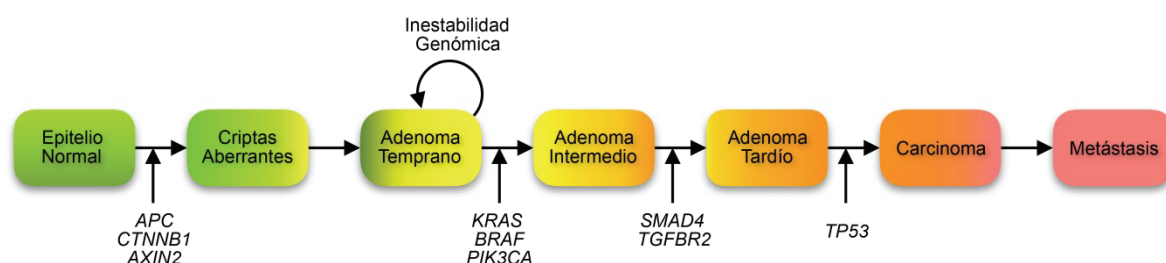


Figura 5. Ruta supresora del CRC. Se muestran las principales mutaciones asociadas a las diferentes fases de la progresión de los tumores de colorrectales que siguen la ruta supresora. Los tumores presentan también otras anomalías menos frecuentes o que no están claramente asociadas a una fase concreta.

La ruta mutadora, y la MSI asociada a ella, se origina por la inactivación de alguno de los genes (*MSH2*, *MLH1*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, o *PMS2*) implicados en el sistema de reparación de apareamientos incorrectos (MMR) que tienen lugar principalmente durante la replicación del DNA en la fase S del ciclo celular. Esta inactivación se debe mayoritariamente al silenciamiento epigenético por metilación del promotor o, en menor medida, a la mutación de dichos genes [191, 203].

3. Vitamina D y cáncer colorrectal

En 1980, Garland y Garland propusieron por primera vez que la radiación UV-B y la consecuente producción de vitamina D en la piel protege frente al CRC. Esta hipótesis se basa en la observación de que la mortalidad por CRC está inversamente asociada con la exposición a la luz solar [74]. Desde entonces, numerosos estudios epidemiológicos han mostrado que existe una correlación inversa entre los niveles circulantes de 25(OH)D₃ (el mejor indicador del estado vitamínico D de un individuo, ya que incluye la producción endógena y la procedente de la dieta) y la incidencia y mortalidad por CRC [66, 79, 80, 104, 124, 137, 144, 177, 223]. Además, elevados niveles circulantes de 25(OH)D₃ pre o postdiagnóstico se asocian con una mayor supervivencia en CRC [66, 137, 223, 263]. De acuerdo

con esto, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud indicó en el año 2008 que la evidencia epidemiológica que apoya la existencia de una relación inversa entre los niveles circulantes de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y la incidencia de CRC es consistente y convincente, y que, por tanto, es “probable” que exista una relación causal entre la vitamina D y el CRC. Sin embargo, también señaló que para la demostración definitiva de causalidad son necesarios más estudios epidemiológicos a gran escala y ensayos clínicos prospectivos [104].

3.1. Expresión de VDR en cáncer colorrectal

La expresión de VDR es el principal determinante de la respuesta celular a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aunque ésta también depende de la actividad de las enzimas que sintetizan y catabolizan la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (CYP27B1 y CYP24A1), y de los niveles de expresión de los correpresores y coactivadores de VDR [66, 177]. Varios estudios muestran que VDR se expresa en la mucosa normal del colon y que su expresión aumenta en las lesiones precancerosas y en los estadios tempranos de la tumorigénesis colorrectal (ACFs, pólipos y adenomas), mientras que disminuye en los estadios avanzados, especialmente cuando los tumores están poco diferenciados [39, 40, 142, 151, 209]. Los niveles de VDR también son muy bajos en las metástasis de CRC en nódulos linfáticos [142]. Nuestro grupo ha descrito que los factores de transcripción SNAIL1 y SNAIL2 (o SLUG) reprimen la expresión de VDR y bloquean las acciones antitumorales de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células de CRC. De acuerdo con esto, altos niveles de estos factores de transcripción correlacionan con baja expresión de VDR en muestras procedentes de pacientes con CRC [120, 172, 175]. Esta pérdida de expresión de VDR conllevaría la resistencia a una posible terapia con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o sus análogos, y podría, en principio, limitar la aplicabilidad de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a la prevención y al tratamiento del CRC en etapas tempranas.

3.2. Efectos antitumorales de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cáncer colorrectal

Numerosos estudios con células en cultivo y modelos animales de CRC muestran que la actividad antitumoral de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en esta neoplasia se debe principalmente a sus efectos antiproliferativos, prodiferenciadores y proapoptóticos. Estas acciones pueden suceder independientemente o conjuntamente, y el efecto predominante puede variar dependiendo de las características (nivel de expresión de VDR, grado de diferenciación, mutaciones, etc) de la célula o modelo animal utilizado [51, 54, 136, 163, 177].

3.2.1. Proliferación

La inhibición de la proliferación es uno de los principales mecanismos responsables de los efectos antitumorales de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en CRC [136]. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promueve una parada del ciclo celular en la fase G_0/G_1 mediante la inducción de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas $p21^{\text{CIP1}}$

y p27^{KIP1} y la represión de las ciclinas A y F. Además, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la fase G₂/M a través de la inducción de GADD45A, implicado en la parada de ciclo celular por daño en el DNA y necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica [173]. La 1,25(OH)₂D₃ regula también otros genes relacionados con la proliferación como *c-MYC*, *c-FOS* y *c-JUN* [146, 171, 173] e interfiere vías de señalización que promueven el crecimiento celular como la del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la del factor de crecimiento insulínico (IGF) [54, 209, 234]. Por otro lado, la 1,25(OH)₂D₃ induce la expresión del receptor de TGF-β tipo 1 (TGFB1), sensibilizando a las células de CRC a la acción antiproliferativa del TGF-β [54].

De acuerdo con esto, la 1,25(OH)₂D₃ y sus análogos inhiben el crecimiento de tumores generados en ratones inmunodeprimidos por la implantación subcutánea de células de CRC (*xenografts*) [59, 115, 229] y en modelos animales de CRC inducido con diferentes agentes químicos [69, 103, 127, 163, 192]. De forma similar, el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ o sus análogos de ratones *Apc*^{Min/+}, un modelo murino de CRC que presenta una mutación del gen *Apc* y desarrolla espontáneamente múltiples adenomas y carcinomas en el tracto intestinal [221], reduce la carga tumoral total [101]. Además, la delección de *Vdr* en dichos ratones (ratones *Apc*^{Min/+}*Vdr*^{-/-}) incrementa el tamaño de los tumores, indicando la pérdida del efecto inhibitorio de la 1,25(OH)₂D₃ [122, 267]. También se ha descrito que la 1,25(OH)₂D₃ y sus análogos tienen un efecto sinérgico con determinadas drogas antitumorales (5-fluorouracilo, 5-FU; irinotecán; oxaliplatino) en la inhibición del crecimiento de *xenografts* de CRC, y que el tratamiento combinado mejora la supervivencia de los ratones [148-150]. Asimismo, un ensayo clínico reciente ha mostrado que el tratamiento de pacientes con adenomas de colon con vitamina D₃ durante 6 meses aumenta la expresión de p21^{CIP1} en las criptas de la mucosa normal del recto [65].

3.2.2. Diferenciación

Numerosos trabajos muestran que la 1,25(OH)₂D₃ promueve la adquisición de un fenotipo epitelial diferenciado en células de CRC [177]. La 1,25(OH)₂D₃ induce la expresión en estas células de enzimas que se localizan en las microvellosidades de los enterocitos y que se consideran marcadores de diferenciación en el colon, como la fosfatasa alcalina y la maltasa [54]. Además, el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ aumenta la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular a través de la inducción de la expresión de proteínas implicadas en la mayoría de estructuras de adhesión celular de los epitelios como: E-cadherina de las uniones adherentes [171]; ocludina, *zonula occludens* 1 y 2 (ZO-1 y ZO-2), claudina-1, -2, -7 y -12 de las uniones estrechas [73, 171]; plectina de los desmosomas y hemidesmosomas [173]; integrina α3 y paxilina de las uniones focales [162]; y proteínas constituyentes del citoesqueleto de filamentos intermedios como queratina-13, o asociadas al citoesqueleto de actina como vinculina, filamina A y ezrina [171, 173].

La 1,25(OH)₂D₃ también induce la diferenciación epitelial inhibiendo la transición epitelio-mesénquima (EMT), proceso por el cual células epiteliales polarizadas se convierten en células mesenquimales móviles [183]. La activación de la EMT depende de señales como el TGF-β (un inductor potente de EMT) y está dirigida por varios factores de transcripción (EMT-TFs) que imponen en las células un programa de expresión génica caracterizado por la represión de marcadores epiteliales como E-cadherina y la inducción de marcadores mesenquimales [46, 117]. Varios trabajos han descrito que la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la expresión de los EMT-TFs SNAIL1 y SNAIL2 (o SLUG) en ausencia o presencia de TGF-β1/β2 en células de CRC [41, 70]. Además, la 1,25(OH)₂D₃ reduce el aumento de invasión y migración inducido por TGF-β1/β2 en dichas células.

3.2.3. Apoptosis

La 1,25(OH)₂D₃ no causa por sí misma apoptosis en células de CRC, pero sensibiliza a estas células a la apoptosis activada por otros estímulos mediante la inducción de la expresión de proteínas proapoptóticas como BAK1 y promoviendo la salida del núcleo de la proteína antiapoptótica BAG1 [14]. De acuerdo con esto, un ensayo clínico con pacientes con adenomas de colon tratados diariamente con vitamina D₃ mostró un aumento de la expresión de la proteína proapoptótica BAX en las criptas de la mucosa normal del recto, siendo el efecto más pronunciado en la zona de diferenciación (mitad superior de la cripta) [64]. Además, la 1,25(OH)₂D₃ aumenta la sensibilidad al agente quimioterapéutico 5-FU en células de CRC reprimiendo la expresión de la proteína antiapoptótica survivina y de la enzima timidilato sintasa, involucrada en la síntesis de DNA *de novo* y que es diana molecular del 5-FU [130].

3.2.4. Antagonismo de la vía de señalización Wnt/β-catenina

Como se ha comentado previamente, la activación aberrante de la vía de señalización Wnt/β-catenina se observa en la mayoría de los CRC y es clave para esta tumorigénesis. La 1,25(OH)₂D₃ es capaz de antagonizar esta ruta en células de CRC por varios mecanismos. Primero, promueve la asociación de VDR con β-catenina, reduciendo la cantidad de β-catenina unida a factores de transcripción TCF/LEF [118, 171, 208]. Segundo, induce la expresión de E-cadherina, que atrae por afinidad a β-catenina causando la salida de ésta del núcleo y su relocalización en las uniones adherentes de la membrana plasmática [118, 171]. Tercero, induce la expresión de DKK1, un inhibidor extracelular de la vía [2, 118]. Como consecuencia, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la expresión de numerosos genes diana de la ruta Wnt/β-catenina como *c-MYC*, *LEF1*, *AXIN2*, *PPARδ*, *CD44*, *ENC1* y *EPHB2* en células de CRC [122, 123, 171]. Además, la 1,25(OH)₂D₃ reprime de forma directa la expresión de *c-MYC* a través de múltiples VDREs presentes en el promotor del gen y en regiones intragénicas, y de forma indirecta aumentando la expresión de su antagonista, el represor

transcripcional MXD1 [146, 200, 235]. También se ha descrito otro mecanismo de inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que involucra al estroma tumoral. Los macrófagos secretan interleuquina- 1β (IL- 1β) que actúa sobre las células de CRC inhibiendo en ellas la degradación de β -catenina, lo que conlleva una mayor actividad transcripcional de la ruta en dichas células. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reduce la secreción de IL- 1β por los macrófagos, reduciendo así la actividad de la ruta de Wnt/ β -catenina en las células de CRC [110, 118].

De acuerdo con esto, los tumores de los ratones $Apc^{\text{Min/+}}Vdr^{-/-}$ presentan mayores niveles de β -catenina nuclear y una expresión más elevada de los genes diana de la vía Wnt/ β -catenina que los tumores de los ratones $Apc^{\text{Min/+}}Vdr^{+/+}$ [122, 267]. Asimismo, cabe destacar que un ensayo clínico reciente con pacientes con adenomas de colon ha mostrado que la suplementación con vitamina D_3 reduce la expresión de β -catenina y aumenta la de E-cadherina y APC en la zona de diferenciación de las criptas de la mucosa normal del recto, confirmando los datos obtenidos en cultivos celulares y modelos animales y apoyando la hipótesis de que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antagoniza la vía de señalización Wnt/ β -catenina [3].

3.2.5. Otros genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células de CRC

El primer estudio de los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la expresión génica global de células de CRC mostró que un alto porcentaje de los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ están relacionados con la transcripción y la adhesión celular [173]. Desde entonces, nuestro grupo ha caracterizado la implicación de algunos de estos genes en la acción antitumoral de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en esta neoplasia. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la expresión del gen *CST5* que codifica cistatina D, un inhibidor de cisteín proteasas de la familia de las catepsinas, y del gen *KDM6B/JMJD3* que codifica una demetilasa de la lisina 27 de la histona H3. Ambas proteínas median la inducción de E-cadherina, los efectos antiproliferativo y prodiferenciador, y el antagonismo de la vía Wnt/ β -catenina promovidos por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células de CRC. Además, inhiben la expresión de EMT-TFs como SNAIL1, ZEB1 y ZEB2, contribuyendo así al mantenimiento del fenotipo epitelial [6, 176]. Por otro lado, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la expresión de SPROUTY-2, un regulador de la señalización por receptores tirosina quinasa que modula el crecimiento y la diferenciación celular. De hecho, SPROUTY-2 reprime la expresión basal y la inducida por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de E-cadherina en células de CRC a través de la elevación de los niveles de ZEB1 [11, 12]. Además, nuestro grupo ha descrito que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la expresión de *miR-22*, y que éste media sus efectos antiproliferativos y antimigratorios en células de CRC [5].

4. Influencia de los fibroblastos asociados a tumores en la progresión tumoral

El comportamiento y desarrollo de los tumores está muy influenciado por el microambiente o estroma tumoral que los rodea [20, 213]. Este estroma está compuesto por matriz extracelular

(ECM) y varios tipos de células que interaccionan con las células tumorales propiamente dichas: células endoteliales sanguíneas y linfáticas, pericitos, células del sistema inmune, adipocitos y fibroblastos [9]. Los fibroblastos son células no vasculares, no epiteliales y no inflamatorias que constituyen el principal componente celular del estroma tumoral.

Los fibroblastos normales (NFs) son células con fenotipo fusiforme y un prominente citoesqueleto de actina y de filamentos intermedios de vimentina [111]. Están presentes en el tejido conjuntivo subyacente a los epitelios y son los encargados de la deposición de la ECM y del mantenimiento de su homeostasis mediante la secreción de sus proteínas constituyentes, así como de metaloproteasas (MMPs) y otras enzimas modificadoras de la ECM. Además, los fibroblastos regulan la diferenciación epitelial y la formación de la membrana basal, y están implicados en procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas [20, 111]. Al producirse un daño tisular, las células epiteliales dañadas o células mononucleares infiltradas como monocitos o macrófagos liberan diferentes factores de crecimiento como TGF- β , EGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) que provocan que los fibroblastos residentes en el tejido adquieran un fenotipo de “fibroblasto activado” o miofibroblasto caracterizado por una mayor proliferación, una reorganización del citoesqueleto de actina con elevada formación de fibras de estrés que les confieren alta contractilidad, y una importante alteración de su secretoma. Así, los fibroblastos activados contraen la ECM para acercar los bordes de la herida, secretan componentes de la ECM para reparar el tejido, y atraen a las células epiteliales para completar el cierre de la herida [111, 157]. Otras vías de activación de fibroblastos son la comunicación directa célula-célula a través de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) o la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM1) [31]. La activación se puede producir también por especies reactivas de oxígeno (ROS) de modo dependiente o independiente de TGF- β [48, 210], por el factor del complemento C1 o por una composición alterada de la ECM [111].

Existe también activación de fibroblastos en algunas situaciones patológicas como la inflamación crónica, la fibrosis y el cáncer. Los fibroblastos activados presentes en el entorno tumoral se denominan fibroblastos asociados a tumores (CAFs), se encuentran en casi todos los tumores sólidos (aunque su abundancia varía según el tipo de cáncer), y tienen un papel clave en la progresión tumoral [83, 111, 157, 213].

4.1. Características de los fibroblastos asociados a tumores

4.1.1. Marcadores de CAFs

Los CAFs pueden identificarse por una serie de marcadores moleculares como la α -actina de músculo liso (α -SMA), la proteína de unión a calcio S100A4 (también denominada proteína específica de

fibroblastos 1), la proteína de activación de fibroblastos α (FAP- α), el antígeno neuro-glial 2 (NG2; también denominado proteoglicano de tipo condroitín sulfato 4), el receptor de PDGF de tipo β (PDGFR- β), o la podoplanina (PDPN) [168, 206, 222]. Sin embargo, ninguno de estos marcadores es exclusivo de los CAFs, ya que pueden expresarse en otros tipos celulares reflejando la plasticidad de las células del estroma [9]: algunos NFs expresan α -SMA, se ha detectado expresión de S100A4 en células epiteliales sometidas a procesos de EMT y en células derivadas de la médula ósea como macrófagos que responden al daño tisular, los pericitos expresan PDGFR- β , y PDPN se expresa en algunas células tumorales y es también un marcador de vasos linfáticos [8, 9, 88, 159, 167, 184]. Por tanto, permanece sin identificar un marcador exclusivo de los CAFs que los distinga de los NFs residentes en el tejido o de otros tipos celulares que puedan estar presentes en el entorno tumoral [19].

4.1.2. Origen de los CAFs

Los CAFs presentan una elevada heterogeneidad que se debe principalmente a que pueden proceder de distintos orígenes según el tejido en el que se genera el tumor y el microambiente local paracrino [9]. El origen más directo de los CAFs son los NFs residentes en el tejido, como consecuencia principalmente de la acción que sobre éstos ejerce el TGF- β secretado por las células de carcinoma [88, 215]. Estos fibroblastos activados pueden, a su vez, secretar elevadas cantidades de TGF- β generando una señalización paracrina y amplificando la reacción estromal, lo que mantiene la activación de los fibroblastos residentes en el tejido [24]. Otra fuente de CAFs son las células troncales mesenquimales, que tras la estimulación por moléculas derivadas de las células de carcinoma pueden transdiferenciarse a miofibroblastos [9, 157, 213]. Por otro lado, una población de NFs o de células troncales mesenquimales puede adquirir alteraciones que conlleven su activación, dando lugar a una expansión y selección clonal [213]. Además de estas fuentes locales, los CAFs pueden proceder de células endoteliales, pericitos, adipocitos, y de fibrocitos derivados de la médula ósea. Como consecuencia de distintas señales liberadas por el tumor, todas estas células pueden ser reclutadas al entorno tumoral y sufrir una transdiferenciación a miofibroblastos [9, 24, 111, 178]. El proceso por el cual las células endoteliales se transdiferencian a miofibroblastos se denominada transición endotelio-mesénquima (EndMT) y conlleva la represión de CD31 y la inducción de S100A4 [9, 24, 157]. Asimismo, los CAFs pueden originarse a partir de células epiteliales normales o de células de carcinoma a través del proceso de EMT, aunque en el segundo caso podrían distinguirse de otros CAFs del entorno tumoral por presentar las alteraciones genéticas características de las células de carcinoma (**Figura 6**) [111, 157, 213].

4.1.3. Propiedades protumorales de los CAFs

Se ha propuesto que los CAFs contribuyen a cada una de las etapas de la progresión tumoral, desde estadios tempranos hasta el crecimiento de las células tumorales en las metástasis, aunque no está claro si son capaces de producir la transformación maligna de células epiteliales normales [9, 111]. Los CAFs promueven la tumorigénesis por múltiples mecanismos (**Figura 6**). Secretan citoquinas (IL-6, CXCL8, CXCL12) y factores de crecimiento como TGF- β , EGF, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que actúan paracrinamente sobre las células de carcinoma y sobre otras células del entorno tumoral como células del sistema inmune, células endoteliales y pericitos [9, 20]. De esta manera, los CAFs pueden inducir la EMT en las células de carcinoma incrementando sus capacidades migratorias y metastásicas, y también promover cambios metabólicos en las células tumorales que favorecen su adaptación a las disponibilidades metabólicas del tumor contribuyendo así a la tumorigénesis. Además, se ha descrito que los CAFs aumentan la población de CSCs presente en los tumores promoviendo la pluripotencialidad de las células tumorales a través de la secreción de IL-6, IL-17A, CXCL7, prostaglandina E2 y HGF que modulan la ruta de señalización Wnt/ β -catenina en las células cancerosas. Los CAFs también promueven el reclutamiento al entorno tumoral de progenitores de la médula ósea y expresan una firma de expresión génica proinflamatoria que crea un microambiente que atrae células mieloides y apoya el crecimiento del tumor y la angiogénesis [9, 23, 157] (**Figura 6**).

Por otro lado, los CAFs sintetizan, depositan y remodelan (volumen, composición proteica, grado de rigidez y orientación de las fibras de colágeno) la ECM del estroma tumoral aumentando la secreción de algunas de sus proteínas constituyentes como colágeno tipo I, tenascina C y fibronectina, e induciendo la expresión de MMPs y de otras enzimas que modifican la ECM (**Figura 6**). En general, el estroma tumoral contiene más cantidad de ECM que el tejido normal, ésta es más rígida, organizada en fibras de colágeno paralelas entre sí y perpendiculares al frente de invasión, y su composición facilita la migración e invasión por parte de las células de carcinoma, ya que éstas expresan proteínas de adhesión celular con elevada afinidad por los componentes de la ECM. Asimismo, la ECM del estroma tumoral facilita la angiogénesis [24, 233]. Aunque la resistencia a la quimioterapia adquirida por las células cancerosas se considera un proceso autónomo, el microambiente tumoral puede participar en la misma protegiendo a las células tumorales de la apoptosis mientras dichas células adquieren las mutaciones necesarias para la protección celular intrínseca. Este proceso puede estar mediado por citoquinas y factores secretados por los CAFs o por otros tipos celulares del estroma tumoral que actúan sobre las células neoplásicas promoviendo en ellas la degradación o redistribución de activadores de apoptosis, aumentando la estabilidad de proteínas antiapoptóticas, y modulando la expresión de reguladores del ciclo celular.

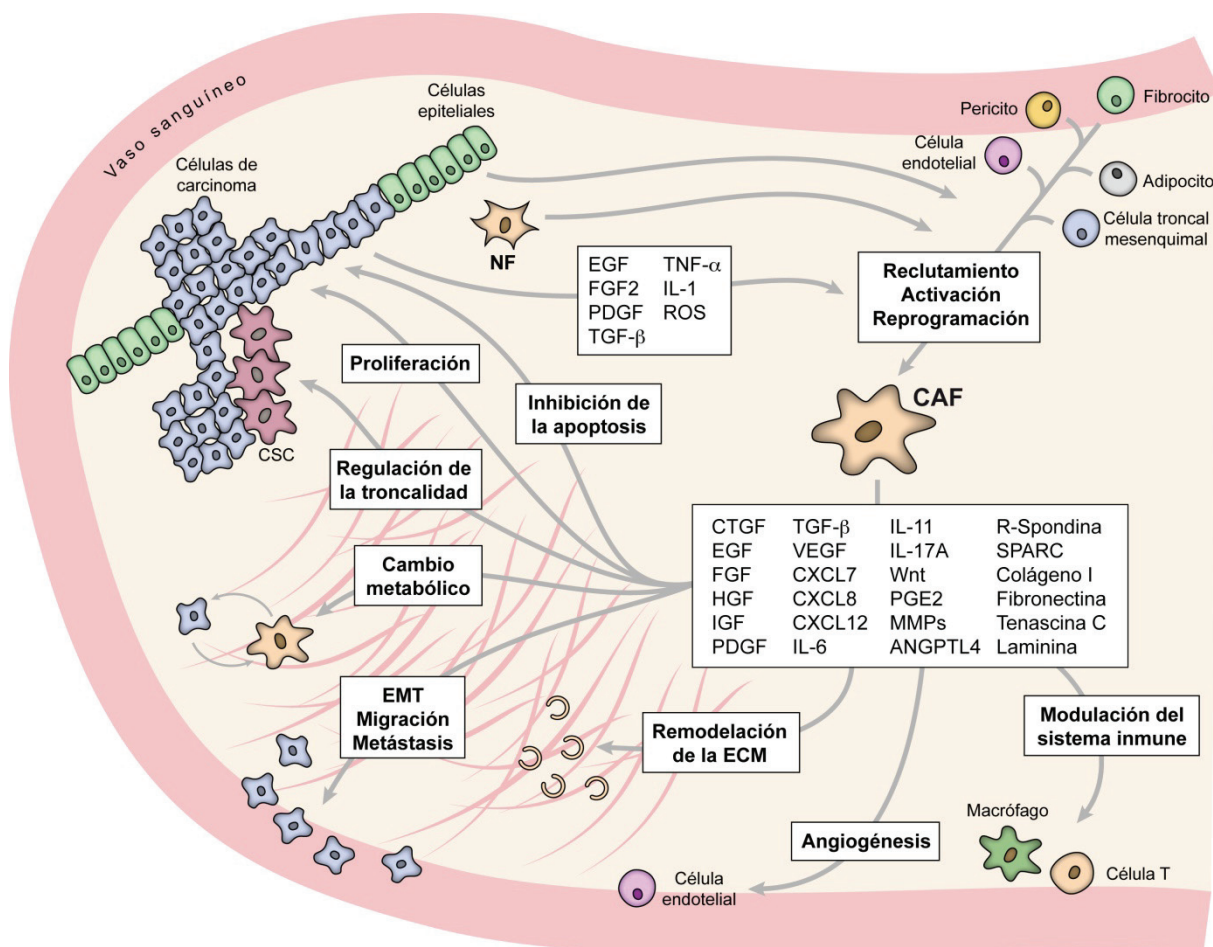


Figura 6. Propiedades protumorales de los fibroblastos asociados a tumores. Los CAFs son una población heterogénea con diferentes orígenes, que contribuyen a la progresión tumoral llevando a cabo diferentes acciones protumorales.

Además, como se ha comentado previamente, los CAFs inducen la EMT en las células neoplásicas, lo que también contribuye a su mayor resistencia a quimioterapia. También se ha descrito que esta insensibilización a drogas promovida por el estroma tumoral puede estar mediada por mecanismos de señalización activados en las células tumorales como consecuencia de su adhesión a determinados componentes de la ECM o de contactos directos célula-célula con células estromales. Asimismo, se ha observado que una elevada cantidad de matriz extracelular dificulta el acceso de la quimioterapia a las células tumorales [157] (**Figura 6**).

Así, cabe pensar que la combinación de terapias dirigidas contra las células estromales y contra las células de carcinoma podría proveer beneficios terapéuticos para los pacientes con cáncer. Sin embargo, la función de los fibroblastos estromales en la progresión tumoral es compleja, ya que también se han propuesto efectos antitumorales de estas células [169, 193]. Por lo tanto, tratamientos dirigidos a la reprogramación de fibroblastos activados a fibroblastos no activados podrían ser más efectivos que aquellos enfocados a la depleción general del estroma [157].

4.2. Fibroblastos asociados a tumores en cáncer colorrectal

En el colon normal (**Figura 4**), los fibroblastos pericriptales que rodean el fondo de las criptas secretan factores Wnt que activan la vía de señalización Wnt/ β -catenina en las células troncales del epitelio colónico y en los progenitores proliferativos, manteniendo así su proliferación. A medida que los progenitores proliferativos ascienden por la cripta, pierden el contacto con los factores Wnt procedentes de los fibroblastos pericriptales, por lo que la vía Wnt/ β -catenina se inhibe y las células paran su proliferación y se diferencian. La activación aberrante de la vía debido a las mutaciones previamente comentadas conlleva la generación de un adenoma y el comienzo de la tumorigénesis colónica [243, 245]. Sin embargo, se ha observado que para que exista una elevada localización nuclear de β -catenina y la activación de la vía sea máxima, las células tumorales deben recibir señales adicionales. Dichas señales proceden, en su mayoría, de los CAFs del estroma tumoral que secretan, entre otros factores, proteínas activadoras de la vía como Wnts y R-Spondinas, citoquinas inflamatorias, la proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC) y HGF, que actúan paracrinamente sobre las células de carcinoma e hiperactivan la vía de señalización Wnt/ β -catenina, promoviendo así la progresión del CRC [48, 49, 125, 249].

El TGF- β tiene un efecto inhibitorio al inicio de la tumorigénesis colónica por su acción antiproliferativa en las células de origen epitelial. Sin embargo, la mayoría de las células de CRC pierden su sensibilidad a TGF- β como consecuencia de la adquisición de mutaciones inactivadoras de la ruta [82, 134, 141]. Curiosamente, dichas células secretan altos niveles de TGF- β que actúa sobre los fibroblastos estromales provocando su activación [88]. Los CAFs así activados secretan numerosos factores como la angiopoyetina-4 (ANGPTL4), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), la IL-11 y el VEGF-A que actúan sobre las células de carcinoma aumentando su capacidad iniciadora de tumores y su potencial metastásico [22, 166]. Además, los fibroblastos activados por TGF- β expresan niveles elevados de tenascina C y HGF, que conjuntamente promueven la invasión de la matriz de colágeno por las células de CRC [50]. De acuerdo con esto, altos niveles de TGF- β correlacionan con elevada expresión de α -SMA, presencia de desmoplasia (cantidad elevada de ECM que acompaña a algunos tumores por activación excesiva de los fibroblastos estromales) y mal pronóstico en CRC [88].

Muchos otros factores secretados están implicados en los efectos protumorales de los CAFs en CRC. Las células de CRC liberan citoquinas como IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que estimulan en los CAFs la secreción de altos niveles de IL-6, una citoquina proinflamatoria [24, 152, 157, 233]. A su vez, la IL-6 promueve que los CAFs secreten VEGF. VEGF induce la permeabilización microvascular generando la extravasación de proteínas del plasma como la fibrina y atrayendo un flujo de fibroblastos, células inflamatorias y células endoteliales, y favoreciendo una ECM rica en fibronectina y colágeno tipo I, lo que promueve la angiogénesis [111, 233]. Adicionalmente, los CAFs de colon secretan EGF, IGF1, IGF2, prostaglandina E2, PDGF, FGF1 y VEGF [45, 153, 174], que activan

las rutas de señalización de MAPK y PI3K/AKT implicadas en proliferación celular (señalización antiapoptótica), síntesis proteica, remodelación del citoesqueleto e invasión [233]. Por otro lado, los CAFs de colon expresan altos niveles de las MMPs protumorales MMP-2 y MMP-12 y de las proteínas de la ECM tenascina C y laminina β 1 que están implicadas en promover la invasión y la metástasis de las células de carcinoma [196].

Recientemente, se ha identificado al EMT-TF SNAIL1 como un importante inductor de las capacidades protumorales de los CAFs de CRC y de otros carcinomas, así como de las propiedades tumorales de las células mesenquimales que originan los sarcomas [4, 91, 92, 220, 266]. Herrera y colaboradores han mostrado que los CAFs de colon expresan niveles superiores de SNAIL1 que los NFs, y que la expresión de SNAIL1 es necesaria para los efectos protumorales de los fibroblastos en CRC: inducción de la migración y la proliferación de las células de carcinoma [91]. De acuerdo con esto, la expresión de SNAIL1 correlaciona con la de los marcadores de fibroblastos activados α -SMA y FAP- α en muestras procedentes de pacientes con CRC [91], y la expresión de SNAIL1 en el compartimento estromal de los tumores colorrectales se asocia con una peor supervivencia de los pacientes [72]. Además, SNAIL1 está implicado en la producción y remodelación (orientación de las fibras) de la ECM por los CAFs promoviendo la formación de una matriz rígida con fibras alineadas que favorece la migración e invasión de las células de carcinoma [220]. Asimismo, la enzima LOXL2, perteneciente a la familia de las lisil oxidasas (LOX) e implicada en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno de la ECM y la estabilización de SNAIL1, se sobreexpresa en los CAFs de colon y es un factor de mal pronóstico en esta neoplasia [238].

Apoyando el papel protumoral de los CAFs en CRC, varios trabajos indican que los tumores colorrectales con peor pronóstico presentan un porcentaje superior de estroma, una mayor reacción desmoplásica, más fibroblastos estromales, y elevada expresión de marcadores de CAFs [37, 94, 102, 216, 241]. En los últimos años se han desarrollado varias clasificaciones moleculares del CRC basadas en perfiles de expresión génica y pronóstico clínico de los pacientes [23, 47, 107, 140, 197]. Varios de los estudios coinciden en que los subtipos de CRC más agresivos y que presentan peor pronóstico se caracterizan por tener un perfil de expresión génica estromal [23, 107]. Dichos subtipos presentan una expresión elevada de genes inducidos en las células estromales por el TGF- β secretado por las células de carcinoma [22]. Por tanto, se ha propuesto que los subtipos de CRC con peor pronóstico podrían predecirse por la expresión de un reducido número de genes o proteínas estromales [17, 23]. Esto pone de manifiesto la importancia del estroma y del microambiente tumoral en la progresión y pronóstico del CRC.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del estroma o microambiente tumoral, y más concretamente de los CAFs, en la progresión del cáncer. Por otro lado, numerosos estudios epidemiológicos muestran que niveles elevados de $25(\text{OH})\text{D}_3$ en plasma se asocian con una menor incidencia y mortalidad por CRC. De acuerdo con esto, se ha caracterizado extensamente que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce acciones antitumorales regulando la expresión génica y el fenotipo de las células de carcinoma de colon. Sin embargo, los posibles efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre los CAFs de colon y sobre la interacción entre éstos y las células de carcinoma de colon no han sido descritos.

A la vista de estos antecedentes, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron:

- 1- Analizar la sensibilidad a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y los efectos de ésta en fibroblastos de diferentes orígenes.
- 2- Caracterizar la sensibilidad a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de cultivos primarios de NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC y estudiar los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre dichos fibroblastos y sobre su interacción con las células de carcinoma de colon.
- 3- Determinar el patrón de expresión génica inducido por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cultivos primarios de NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC.
- 4- Estudiar la expresión de VDR y de algunos de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identificados en el objetivo anterior en muestras tumorales de pacientes con CRC y determinar su posible correlación con la supervivencia de los pacientes.

1. Muestras humanas

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos grupos de muestras de pacientes con CRC con diferentes características y procedencia para dos finalidades distintas: establecer cultivos primarios de fibroblastos humanos de colon normal y tumoral, y analizar la expresión de determinadas proteínas por inmunohistoquímica.

Para establecer los cultivos primarios de fibroblastos humanos se emplearon tejidos frescos del tumor primario de colon y de la mucosa colónica morfológicamente normal (tomada al menos a 5 cm de distancia del margen quirúrgico) de 32 pacientes con CRC sometidos a cirugía en el Hospital Universitario La Paz (Madrid, España) entre los años 2013 y 2015. Las muestras fueron facilitadas por el Biobanco del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (RD09/0076/00073) integrado en la Red Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz (HULP-PI-1425) y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. Los datos clinicopatológicos de los pacientes ([Tabla 1](#)) se obtuvieron de las historias clínicas e incluyen edad y género del paciente, localización y grado de diferenciación del tumor primario, presencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales y de metástasis distantes, y estadio de la enfermedad establecido según los criterios del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Esta clasificación clínica del CRC es la más usada en la actualidad y se basa en el sistema TNM que tiene en cuenta la extensión del tumor primario (T), la afectación de nódulos linfáticos regionales (N), y la existencia de metástasis distantes (M) [156]. Según esta clasificación, los pacientes en estadio AJCC 0 presentan un carcinoma *in situ* sin afectación de nódulos linfáticos regionales ni presencia de metástasis distantes, los pacientes en estadio AJCC I presentan un tumor primario que invade como máximo la capa muscular gruesa más externa que rodea al colon (*muscularis propria*) sin afectación de nódulos linfáticos regionales ni presencia de metástasis distantes, los pacientes en estadio AJCC II presentan un tumor primario que atraviesa la *muscularis propria* e invade tejidos, estructuras u órganos adyacentes sin afectación de nódulos linfáticos regionales ni presencia de metástasis distantes, los pacientes en estadio AJCC III presentan metástasis en nódulos linfáticos regionales, y los pacientes en estadio AJCC IV presentan metástasis distantes.

Para los estudios de inmunohistoquímica se utilizaron secciones de tumores primarios de colon de 658 pacientes con CRC metastásico procedentes del Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (PT13/0010/0012; Madrid, España) integrado en la Red Nacional de Biobancos. Para ello se seleccionaron retrospectivamente pacientes diagnosticados con CRC metastásico entre los años 1998 y 2009 que cumplieran los siguientes criterios: disponibilidad de tejido del tumor primario, diagnóstico de adenocarcinoma, presencia de metástasis distantes, ausencia de utilización de terapia neoadyuvante antes de la extirpación del tumor primario, y seguimiento clínico del paciente [18,7

meses de seguimiento clínico de media). De acuerdo con las recomendaciones clínicas de la Fundación Jiménez Díaz y de la Sociedad Europea de Oncología Médica [242], el seguimiento de los pacientes se realizó cada 3-6 meses e incluyó examen físico, tomografía axial computarizada torácica y abdominal, y medición de los niveles del antígeno carcinoembrionario. Los datos clinicopatológicos de los pacientes (**Tabla 11**) se obtuvieron de las historias clínicas e incluyen edad, género y grado ECOG del paciente, número y localización de las metástasis, y tratamiento quimioterápico administrado. La escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) se utiliza para evaluar la calidad de vida del paciente con cáncer y clasifica a los mismos desde grado 0 (paciente asintomático) hasta grado 5 (paciente fallecido) (<http://ecog-acrin.org/resources/ecog-performance-status>) [160]. También se recogieron los datos de respuesta a la terapia y de la supervivencia de los pacientes. La supervivencia global (OS) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la metástasis hasta la muerte del paciente por cualquier causa o hasta la fecha del último seguimiento. La supervivencia libre de progresión (PFS) se calculó desde el primer día de tratamiento sistémico para la metástasis hasta que se detecta progresión de la enfermedad o hasta la muerte del paciente por cualquier causa. La progresión de la enfermedad se definió como cualquier cambio en el aspecto radiológico de una lesión que cumpla los criterios RECIST (Criterios para Evaluar Respuesta en Tumores Sólidos) para progresión de enfermedad [58], la aparición de una nueva lesión maligna originada a partir del mismo tumor, o el desarrollo de un nuevo tumor en el mismo o en diferente órgano. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz (PIC-15/2014) y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

2. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos de colon humano

Los cultivos primarios de fibroblastos se obtuvieron a partir de tejidos frescos procedentes de piezas quirúrgicas de pacientes con CRC siguiendo la técnica de crecimiento a partir de explante [93, 95]. Las muestras del tumor primario de colon y de la mucosa colónica morfológicamente normal del mismo paciente se lavaron varias veces con PBS y se incubaron durante 30 min en PBS suplementado con 0,5 mg/ml *Primocin* (Invivogen, San Diego, California, EEUU), 0,1 mg/ml gentamicina y 0,5 µg/ml anfotericina B (ambos de Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU). A continuación, los tejidos se cortaron en pequeñas piezas de aproximadamente 3 mm³ de tamaño que se colocaron en botellas de cultivo (*flasks*) en presencia de suero fetal bovino (FBS) (Life Technologies) suplementado con 0,25 mg/ml *Primocin*. Después de una semana y para facilitar el crecimiento de los fibroblastos, se reemplazó el FBS por *Fibroblast Growth Medium-2* (FGM-2; Lonza, Basel, Suiza). Los fibroblastos crecieron alrededor del explante durante aproximadamente 3 semanas (**Figura 13**), momento en el cual los fragmentos de tejido se retiraron y los fibroblastos se recuperaron por tripsinización. Los

fibroblastos primarios se subcultivaron rutinariamente en un ratio 1:2 en FGM-2, y todos los experimentos se realizaron con fibroblastos en pase 7 como máximo.

3. Cultivos celulares

Las líneas celulares IMR90 (ATCC CCL-186), BJ-hTERT (ATCC CRL-4001), NIH3T3 (ATCC CRL-1658), CCD18Co (ATCC CRL-1459), HT29 (ATCC HTB-38), HCT116 (ATCC CCL-247), CACO2 (ATCC HTB-37), MCF7 (ATCC HTB-22), HEK293T (ATCC CRL-3216) y SW480-ADH se cultivaron en DMEM 10% FBS (ambos de Life Technologies). Las células SW480-ADH son una subpoblación derivada de la línea celular SW480 (ATCC CCL-228) [171] y las células SW480-ADH shVDR y shControl se generaron previamente en el laboratorio [162]. La línea celular THP1 (ATCC TIB-202) se cultivó en RPMI-1640 10% FBS (ambos de Life Technologies). Las líneas celulares se autentificaron periódicamente usando el *GenPrint 10 System* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU), y los resultados se compararon con los disponibles en la base de datos de líneas celulares de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, Virginia, EEUU). Las células se trataron con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ (Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, EEUU) o con el volumen correspondiente de vehículo (etanol). Para los experimentos que se indica las células se trataron con 100 ng/ml de las quimioquinas recombinantes CCL2, CCL11 o CCL13 (R&D Systems, Minneapolis, Minesota, EEUU) o con el volumen correspondiente de vehículo (0,5% BSA). Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con un vector de expresión de VDR humano (cedido por la Dra. Ana Aranda, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España) o con el vector vacío (pSG5) utilizando *JetPEI transfection reagent* (PolyPlus Transfection, Illkirch, Francia), y las células se analizaron tras 48 h. Las imágenes de contraste de fases de los cultivos celulares se capturaron con una cámara digital DS-L1 acoplada a un microscopio invertido TS100 (Nikon, Tokio, Japón) y se procesaron utilizando el programa Adobe Photoshop CS6 (San Jose, California, EEUU).

4. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia en células en cultivo

Las células se crecieron sobre cristales y se fijaron con metanol frío. Los sitios inespecíficos se bloquearon con PBS al 0,5% BSA y los cristales se incubaron con anticuerpos primarios anti-vimentina (M7020, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti- α -SMA (A5228, Sigma-Aldrich), anti-citoqueratina-18 (61028, Progen, Heidelberg, Alemania), anti-E-cadherina (610182, BD Bioscience, San Jose, California, EEUU) o anti-VDR (12550, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EEUU), y después con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con el fluoróforo AlexaFluor-488 (Life Technologies). Para evaluar las reacciones inespecíficas de los anticuerpos secundarios, cristales equivalentes se incubaron sin anticuerpo primario o con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo primario (3900, Cell Signaling; para el marcaje de VDR). A continuación, los cristales se

incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich) para teñir el núcleo celular y se montaron utilizando *ProLong Gold Antifade Reagent* (Life Technologies). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal espectral LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) usando láseres de ion argón (488 nm) y de diodo violeta (405 nm). Las imágenes se adquirieron secuencialmente por registro directo utilizando el programa ZEN 2009 (Carl Zeiss). Todas las imágenes se procesaron usando Adobe Photoshop CS6.

5. Extracción de RNA y RT-qPCR

El RNA total de las líneas celulares y de los fibroblastos primarios se obtuvo utilizando el *NucleoSpin miRNA extraction kit* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). El RNA total de los tejidos (*Human Total RNA Master Panel II*) se adquirió a Clontech (Mountain View, California, EEUU). El RNA fue retrotranscrito usando el *iScript cDNA Synthesis kit* (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU). La reacción de qPCR se realizó en un *CFX384 Real-Time PCR Detection System* (BioRad) usando *TaqMan Universal Master Mix II* o *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies). La reacción de qPCR se inició con un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min y consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y alineamiento y elongación a 60°C durante 30 s. Se utilizaron sondas *TaqMan* para *CYP24A1* (Hs00167999_m1), *CHRD1* (Hs01035484_m1), *NID2* (Hs01547192_m1), *SEMA3B* (Hs01090156_m1), *TIMP3* (Hs00927214_m1), *CD82* (Hs01017982_m1), *CXCL12* (Hs00171022_m1), *CCL11* (Hs00237013_m1), *CCL13* (Hs00234646_m1), *S100A4* (Hs00243202_m1), *CYTL1* (Hs01573280_m1), *CCL2* (Hs00234140_m1), *GAPDH* (Hs02758991_g1), *B2M* (Hs99999907_m1) y *RPLP0* (Hs99999902_m1) (Life Technologies); y oligonucleótidos cebadores para *VDR* (Directo: AACGCTGTGTGGACATCGGC; Reverso: CGCAGACTGTCCTTCAAGGC), *OPN* (Directo: TTGCAGTGATTGCTTTTGC; Reverso: GTCATGGCTTTCGTTGGACT), *SDHA* (Directo: TGGGAACAAGAGGGCATCTG; Reverso: CCACCACTGCATCAAATTCATG), *Cyp24a1* de ratón (Directo: CGCCTTCCAAAAGAAACTCA; Reverso: CCCATAAAATCAGCCAAGA) y *Sdha* de ratón (Directo: CAGACCTGCGGCTTTCAC; Reverso: TCCAGCGCTACAACCAC) (Sigma-Aldrich). En los experimentos con líneas celulares, los valores de expresión de RNA se normalizaron con respecto al gen constitutivo de referencia *SDHA* usando el método de comparación de C_T . En los experimentos con fibroblastos primarios, los valores de expresión de RNA se normalizaron de forma independiente con respecto a los tres genes constitutivos de referencia *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0* usando el método de comparación de C_T y se calculó la media. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

Los extractos totales celulares se prepararon por lisis celular durante 25 min en hielo utilizando tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. A continuación, el lisado celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. Los lisados

tumorales se obtuvieron a partir de tumores colorrectales embebidos en OCT (*Optimal Cutting Temperature*). Se realizaron 10 cortes de 10 μm de espesor de cada tumor (para obtener aproximadamente 50 mg de tejido) que se trituraron con un homogeneizador eléctrico y se lisaron durante 45 min en hielo con tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. A continuación, el lisado tumoral se sonicó en hielo a baja amplitud durante 3 intervalos de 30 s y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min a 4°C. Tras incubar durante 15 min más en hielo, se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF bloqueadas con 5% BSA que se incubaron con anticuerpos primarios anti-VDR (para la [Figura 7](#): 04-1526, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU; para la [Figura 22](#): D12550, Cell Signaling Technology), anti- β -actina (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EEUU) o anti-GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich), y a continuación con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la peroxidasa HRP. Para evaluar las reacciones inespecíficas del anticuerpo secundario utilizado en los *Western Blots* de VDR en la [Figura 22](#), membranas equivalentes se incubaron sin anticuerpo primario o con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR (3900, Cell Signaling Technology). La unión del anticuerpo se visualizó con el sistema de detección *Enhanced chemiluminescence* (ECL; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). Las películas fotográficas se escanearon con un escáner HP Scanjet G2710 (Palo Alto, California, EEUU) y se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS6. La cuantificación se hizo por densitometría utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU).

7. Ensayos de proliferación celular

El ensayo utilizado se basa en la reducción metabólica de la sal amarilla bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) a cristales púrpura de formazán por enzimas presentes en las células metabólicamente activas. Los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos y se trataron con 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo. A los tiempos indicados, las células se incubaron con solución MTT (concentración final 0,5 mg/ml, Merck Millipore) durante 4 h a 37°C. En este periodo se formaron cristales de formazán insolubles en agua que se solubilizaron con isopropanol 0,04 M HCl durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, el tinte de formazán se cuantificó usando el espectrofotómetro de microplacas VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EEUU) y se calculó el resultado de restar la absorbancia obtenida a 630 nm de la obtenida a 570 nm (Abs 570 - Abs 630). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

8. Ensayos de contracción de geles de colágeno

Los geles de colágeno se prepararon mezclando los fibroblastos con colágeno bovino de tipo I (PureCol, Advanced Biomatrix, San Diego, California, EEUU), 5x DMEM, 0,1 M NaOH y agua destilada (concentración final: 1,7 mg/ml PureCol, 1x DMEM y 3 mM NaOH) en presencia de 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo. La mezcla se sembró en placas de cultivo de 24 pocillos y se dejó polimerizar. Una vez polimerizado, se añadió medio de cultivo con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo para mantener el mismo tratamiento. Tras 24 h y para iniciar la contracción de los geles de colágeno (tiempo 0), los geles se levantaron de la placa de 24 pocillos y se transfirieron a placas de cultivo de 6 pocillos que contenían medio de cultivo con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo. A los tiempos indicados, se tomaron imágenes con una cámara digital E4500 (Nikon) acoplada a un microscopio estereoscópico MZ6 (Leica, Wetzlar, Alemania), y el área de los geles se cuantificó con el programa Image J. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Adobe Photoshop CS6. Los experimentos se realizaron por triplicado.

9. Ensayos de migración e invasión celular

Para los ensayos de migración e invasión celular se sembraron en medio de cultivo sin FBS y en el compartimento superior de insertos de tipo *Transwell* con poros de 8 µm (Corning Incorporated, Corning, Nueva York, EEUU) el mismo número de fibroblastos pretratados durante 48 h con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o con vehículo. Para los ensayos de invasión, la superficie superior del inserto se preincubó con 12,5 g de *Matrigel Basement Membrane Matrix* (BD Bioscience). En ambos casos, se añadió medio de cultivo con FBS al compartimento inferior y ambos compartimentos se suplementaron con 100 nM de 1,25(OH)₂D₃ o vehículo para mantener el tratamiento previo. Tras 4 h (migración de NIH3T3), 24 h (invasión de NIH3T3, y migración de IMR90 y BJ-hTERT) o 72 h (invasión de IMR90), las células de la superficie superior del inserto se retiraron usando bastoncillos de algodón y las células adheridas a la superficie inferior (células que habían migrado/invadido) se tiñeron con el reactivo *Diff-Quik* (Dade Behring, Deerfield, Illinois, EEUU). Las imágenes de las células teñidas (10 campos/inserto) se capturaron con una cámara digital Olympus DP70 (Center Valley, Pensilvania, EEUU) montada en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss), y las células que habían migrado/invadido se contaron con el programa Image J. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Adobe Photoshop CS6. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para los ensayos de inducción de la migración de las células SW480-ADH por los fibroblastos, éstos se sembraron en el compartimento inferior de insertos de tipo *Transwell* con poros de 8 µm y se trataron con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Pasado ese tiempo, la monocapa de fibroblastos se lavó, se añadió medio de cultivo, y las células SW480-ADH se sembraron en el compartimento superior de los insertos en medio de cultivo sin FBS ([Figura 17](#)). Tras 24 h, el número

de células SW480-ADH que habían migrado se cuantificó del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron por triplicado y como control se utilizaron insertos en los que no se habían sembrado fibroblastos en el compartimento inferior.

10. Análisis de la expresión génica global mediante *microarrays*

El RNA total de 7 parejas de cultivos primarios de NFs y CAFs procedentes del mismo paciente y tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h se obtuvo como se ha descrito en el apartado de extracción de RNA. Los RNAs se marcaron usando el *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labelling) Kit* y se hibridaron con *Human Gene Expression G3 60K V.2 Microarrays (design ID 039494)* (ambos de Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Las imágenes se analizaron y cuantificaron con el *Agilent Feature Extraction Software V.11.5* que realiza una cuantificación característica y correcciones aditivas *detrend*.

La corrección de la señal de fondo de los *microarrays* se llevó a cabo utilizando el método *normexp*. Para normalizar todos los datos se realizó una normalización *loess* dentro de cada *microarray* y una normalización por cuantiles entre los distintos *microarrays*. Los genes diferencialmente expresados entre las dos condiciones experimentales a comparar se obtuvieron aplicando modelos lineales y test *t* pareados disponibles en el paquete de programas Bioconductor's *limma* (<http://www.bioconductor.org>) [218]. El nivel estimado de significación estadística (*p* valor) se ajustó para comparaciones múltiples utilizando la corrección *Benjamini & Hochberg False Discovery Rate* (FDR). Aquellos genes con FDR < 0,05 se seleccionaron como diferencialmente expresados entre las dos condiciones experimentales. El análisis de enriquecimiento funcional en términos de ontología génica (GO) de los genes diferencialmente expresados se realizó con el programa *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery V6.7* (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), seleccionándose aquellos términos GO que estaban significativamente (FDR < 0,05) enriquecidos. Para analizar el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados por el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs se realizaron diagramas de Venn (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/>).

11. Inmuhistoquímica en tumores colorrectales humanos y análisis estadísticos asociados

Se utilizaron secciones de 3 µm de espesor de tumores colorrectales humanos fijados en formalina y embebidos en parafina. El desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo por calor (95°C) en tampón EDTA pH 9.0 durante 20 min en la plataforma PT Link (Dako). A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena y el marcaje se realizó mediante incubaciones sucesivas con el anticuerpo primario contra la proteína de interés, el *Flex+ linker* correspondiente (Dako), y el polímero *Flex+* acoplado a peroxidasa (Dako). El revelado se realizó con 3,3'-diaminobencidina y las secciones se

contratiñeron con hematoxilina. La señal se detectó usando el *Nuance FX Multispectral Imaging System* (Caliper Life Sciences, Hopkinton, Massachusetts, EEUU) como previamente se ha descrito [26]. Los anticuerpos empleados fueron: anti-VDR, anti-CD82 (12550 y 12439, Cell Signaling Technology) y anti-S100A4 (A5114, Dako). Para evaluar la especificidad del marcaje de VDR, tres secciones equivalentes de intestino delgado de ratones *Vdr*^{+/+} y *Vdr*^{-/-} [122, 129] y de 10 tumores colorrectales humanos se incubaron con anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anti-VDR (3900, Cell Signaling Technology), o sin anticuerpo primario. Para la tinción de VDR en tejidos de ratón, la incubación con el *Flex+ linker* se sustituyó por una incubación con una IgG control de ratón (Dako).

Para determinar el punto de corte para establecer los grupos de tumores con expresión baja vs alta de VDR, S100A4 o CD82 se realizó un análisis ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para cada proteína considerando como punto final clínico la muerte específica por CRC vs pacientes censurados (pérdida del seguimiento, vivo, o muerto por otras causas), según se ha descrito previamente [194, 269]. Con este análisis, se calcula la sensibilidad y especificidad de diferentes puntos de corte para los valores de expresión de la proteína de interés y se determina el punto en el cual la suma de sensibilidad y especificidad es máxima. Los tumores con valores de expresión superiores o inferiores a dicho punto se consideraron como tumores con expresión alta o baja de la proteína de interés, respectivamente. Se realizaron análisis de supervivencia Kaplan-Meier con test de *log-rank* para trazar las gráficas de supervivencia y estimar las diferencias entre pacientes con expresión alta vs baja de VDR, S100A4 o CD82. El valor pronóstico de la expresión de VDR y de otras variables clinicopatológicas se estimó primero mediante un análisis univariante de regresión de Cox utilizando como puntos finales clínicos OS o PFS desde el evento metastásico. A continuación, y para identificar variables con valor pronóstico independiente, se realizó un análisis multivariante de regresión de Cox incluyendo las variables con valor pronóstico significativo identificadas en el análisis univariante. Las asociaciones entre la expresión de VDR y las características clinicopatológicas de los pacientes se analizaron con el test χ^2 (test exacto de Fisher), y las correlaciones entre la expresión de VDR y la de CD82 o S100A4 en los fibroblastos del estroma de los tumores colorrectales se calcularon con el test U de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS V13.0 (Chicago, Illinois, EEUU). Todos los *p* valores son bilaterales.

12. Análisis del fenotipo de inestabilidad de microsatélites y de mutaciones de BRAF en tumores colorrectales humanos

El fenotipo de MSI se determinó mediante el análisis por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 del sistema MMR en tumores colorrectales humanos usando anticuerpos primarios frente a dichas proteínas (M3640, M3639, M3636 y M3647; Dako) y según el

protocolo detallado en el apartado anterior. Se consideró expresión positiva de las proteínas al marcaje nuclear de las mismas en las células tumorales, utilizando el núcleo de linfocitos infiltrantes y/o de células estromales normales presentes en la misma sección de tejido como control interno positivo; y como falta de expresión a la ausencia completa de marcaje nuclear de las proteínas en las células tumorales existiendo marcaje positivo del control interno. Siguiendo las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (<http://www.nccn.org/>), los tumores que carecen de expresión de al menos una de las proteínas analizadas fueron clasificados como tumores deficientes en el sistema MMR y con fenotipo de MSI.

Para analizar el estado mutacional de la valina 600 (V600) de BRAF en tumores colorrectales humanos se extrajo DNA genómico de secciones de 5 µm de espesor de tumores fijados en formalina y embebidos en parafina usando el *cobas DNA Sample Preparation Kit* (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, California, EEUU). La cantidad de DNA se determinó usando el *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) y se ajustó a una concentración fija por reacción de PCR. El DNA se amplificó y detectó usando el *cobas 4800 System* y el *cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test* (ambos de Roche Molecular Diagnostics). Este ensayo se basa en la tecnología qPCR y la detección se logra por el análisis de una curva de disociación que va de 40°C a 95°C (*TaqMelt*). En todos los análisis se incluyeron controles positivos, negativos y un calibrador para confirmar la validez del ensayo. Además, la amplificación, la detección, el control de calidad del ensayo y la interpretación de los resultados están estandarizados en el sistema.

13. Análisis estadísticos

En los experimentos con cultivos primarios y líneas celulares, los resultados se expresan como la media \pm SEM y la significancia estadística se analizó con el test *t* de Student no pareado de dos colas utilizando el programa GraphPad Instat3 (La Jolla, California, EEUU). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. * indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$. La correlación entre la expresión de RNA de *VDR* y de *CYP24A1* en los cultivos primarios se calculó con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el programa SPSS V13.0. Los análisis estadísticos de los resultados del estudio de la expresión génica global mediante *microarrays* y de los resultados de las inmunohistoquímicas de los tumores colorrectales humanos se han detallado en las secciones correspondientes.

1. Efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en fibroblastos de distintos orígenes

1.1. Fibroblastos de distintos orígenes expresan VDR y responden a 1,25(OH)₂D₃

Como un primer acercamiento al estudio de los posibles efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos del estroma tumoral, analizamos la expresión de VDR y la sensibilidad a 1,25(OH)₂D₃ de tres líneas celulares establecidas de fibroblastos de diferentes orígenes: IMR90 (fibroblastos de pulmón humano), BJ-hTERT (fibroblastos de piel humana inmortalizados con el gen humano que codifica la telomerasa) y NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón). Como se observa en la [Figura 7](#), los tres tipos de fibroblastos expresan niveles basales de VDR (RNA y proteína) que, como se ha descrito en otros tipos celulares [120, 162, 172, 176, 247], aumentan en respuesta al tratamiento con 1,25(OH)₂D₃.

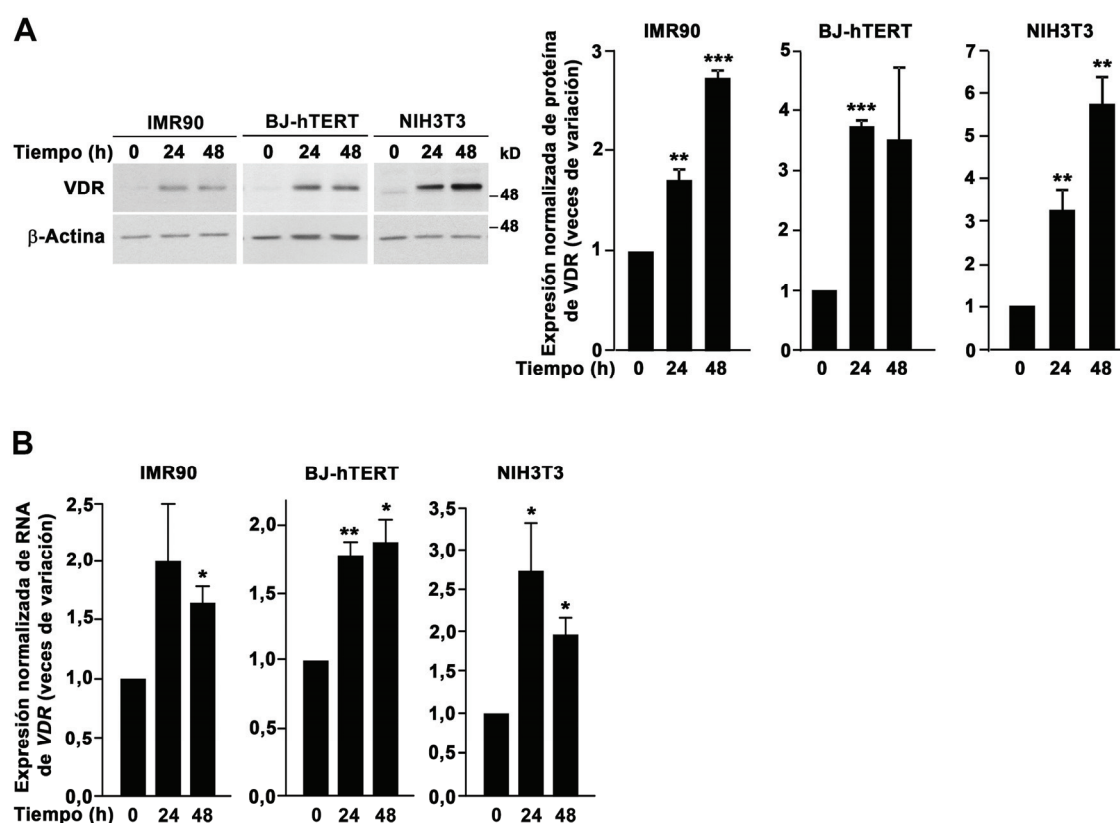


Figura 7. Fibroblastos de diferentes orígenes expresan VDR. (A) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de proteína de VDR en fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante los tiempos indicados. Como control de carga se utilizó β-actina. Se muestran imágenes de un experimento representativo (izquierda) y la media ± SEM de la cuantificación de tres experimentos independientes (derecha). (B) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de RNA de VDR en fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante los tiempos indicados. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *SDHA* según se indica en Materiales y Métodos. Se muestra la media ± SEM de tres experimentos independientes.

A continuación analizamos en las mismas líneas celulares la expresión de RNA de dos genes diana de 1,25(OH)₂D₃: *CYP24A1* ([Figura 8A](#)) y *OPN* (que codifica la osteopontina) ([Figura 8B](#)). Aunque con

distinta magnitud y cinética, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce significativamente la expresión de ambos genes en los tres tipos de fibroblastos. Estos resultados muestran que fibroblastos de diferentes orígenes expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

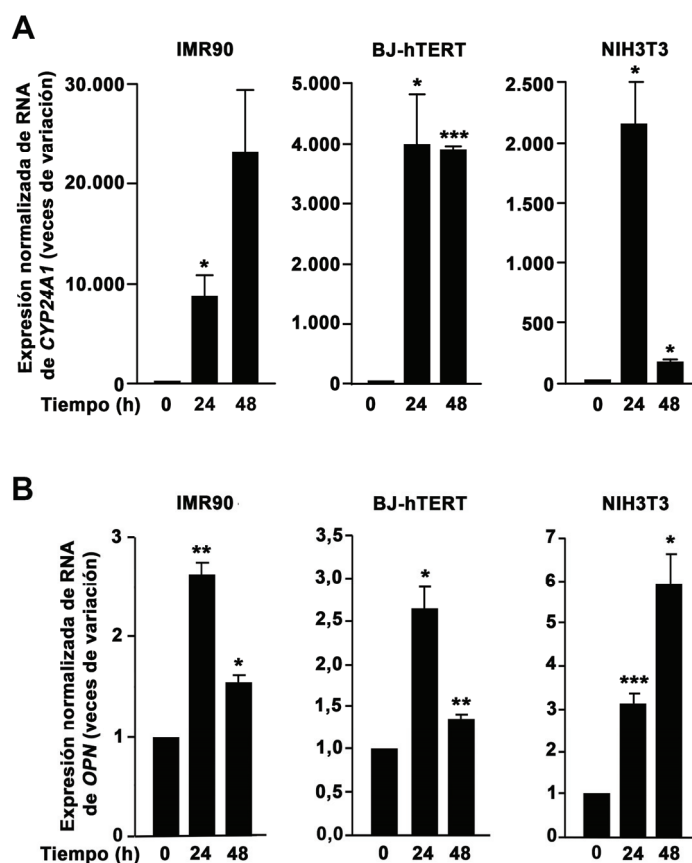


Figura 8. Fibroblastos de diferentes orígenes responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de RNA de *CYP24A1* (A) y de *OPN* (B) en fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 tratados con 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo durante los tiempos indicados. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *SDHA* según se indica en Materiales y Métodos. Se muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

1.2. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe las acciones protumorales de fibroblastos de distintos orígenes

Una de las acciones antitumorales más generales e importantes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es la inhibición de la proliferación celular [136]. Además, se ha descrito que los fibroblastos activados presentan una proliferación incrementada con respecto a los fibroblastos normales [111, 138, 232]. Por todo esto, realizamos ensayos de MTT para analizar si la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula esta propiedad en las líneas celulares de fibroblastos que previamente habíamos caracterizado que expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Observamos que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe (aproximadamente un 20% a las 48 h de tratamiento) la proliferación de los fibroblastos IMR90 (Figura 9A) y NIH3T3 (Figura 9B). Sin embargo, no encontramos diferencias entre la tasa proliferativa de los fibroblastos BJ-hTERT tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o tratados con vehículo (datos no mostrados).

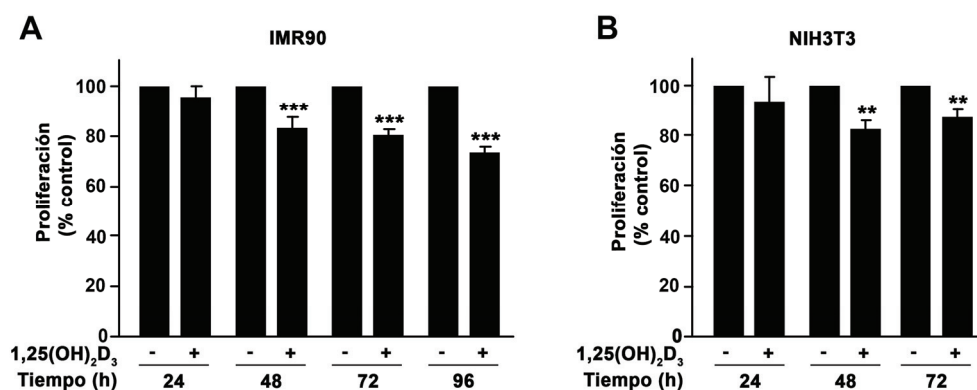


Figura 9. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la proliferación de fibroblastos de diferentes orígenes. Efecto de 100 nM 1,25(OH)₂D₃ sobre la proliferación de fibroblastos IMR90 (A) y NIH3T3 (B) a los tiempos indicados. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la proliferación de los fibroblastos tratados con vehículo a cada tiempo (% control). Se representa la media ± SEM de tres experimentos independientes.

La activación de los fibroblastos conlleva un incremento de sus capacidades migratorias e invasivas [111]. Por tanto, nuestro siguiente paso fue analizar la posible acción de la 1,25(OH)₂D₃ sobre dichas capacidades en las líneas celulares de fibroblastos utilizando ensayos de migración e invasión con insertos de tipo *Transwell*. Estos estudios mostraron que el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ inhibe significativamente la migración de los fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 (Figura 10), y la invasión de los fibroblastos IMR90 y NIH3T3 (Figura 11). La capacidad invasiva de los fibroblastos BJ-hTERT es muy reducida, lo que impidió su estudio.

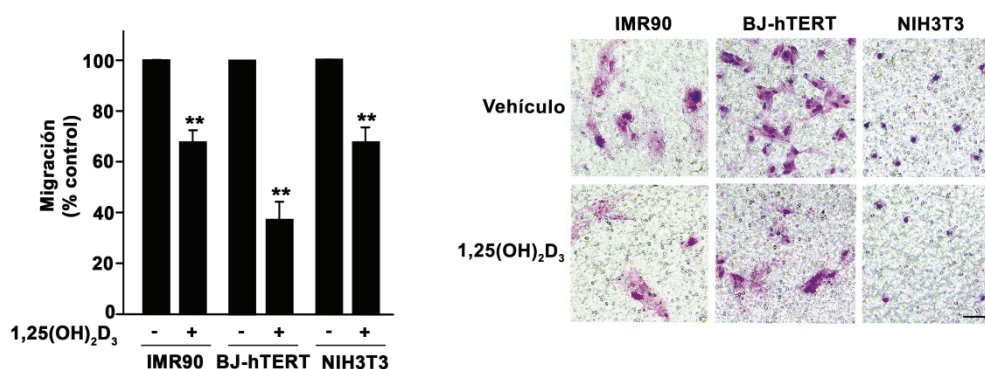


Figura 10. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la migración de fibroblastos de diferentes orígenes. Fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 pretratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h se sembraron sobre insertos de tipo *Transwell* con poros de 8 μm y su capacidad migratoria se analizó a las 4 h (NIH3T3) o a las 24 h (IMR90 y BJ-hTERT) según lo descrito en Materiales y Métodos. Se incluyen las imágenes de un experimento representativo mostrando las células que han migrado y se localizan en la superficie inferior de los insertos (derecha) y la cuantificación (media ± SEM) de tres experimentos independientes (izquierda). Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la migración de las células tratadas con vehículo (% control). Barra de escala, 100 μm.

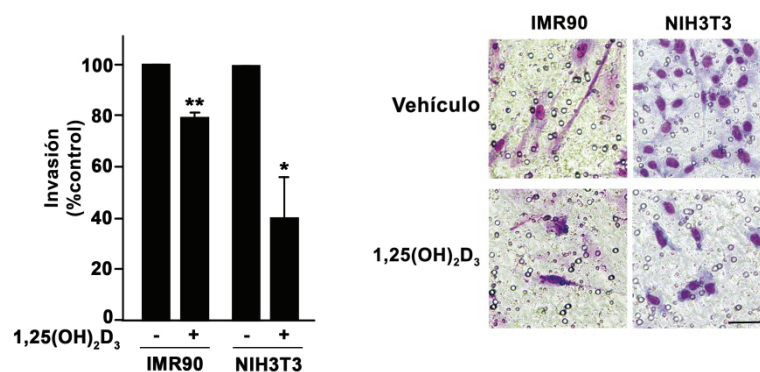


Figura 11. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la invasión de fibroblastos de diferentes orígenes. Fibroblastos IMR90 y NIH3T3 pretratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h se sembraron sobre insertos de tipo *Transwell* con poros de 8 μ m recubiertos con *Matrigel Basement Membrane Matrix* y su capacidad invasiva se analizó a las 24 h (NIH3T3) o a las 72 h (IMR90) según lo descrito en Materiales y Métodos. Se incluyen las imágenes de un experimento representativo mostrando las células que han invadido y se localizan en la superficie inferior de los insertos (derecha) y la cuantificación (media \pm SEM) de tres experimentos independientes (izquierda). Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la invasión de las células tratadas con vehículo (% control). Barra de escala, 50 μ m.

Estudiamos también la capacidad de los fibroblastos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3 de reorganizar las fibras de la ECM y contraer geles de colágeno, una propiedad asociada al fenotipo "activado" de los fibroblastos del estroma tumoral. Para ello, los fibroblastos se embebieron en geles de colágeno en presencia de 1,25(OH)₂D₃ o vehículo, y se cuantificó la reducción observada en el tamaño del gel de colágeno como consecuencia de la contracción ejercida por los fibroblastos. Como se muestra en la **Figura 12**, el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ inhibe la capacidad de contraer geles de colágeno en las tres líneas celulares: a todos los tiempos analizados, los geles de colágeno conteniendo fibroblastos e incubados con 1,25(OH)₂D₃ son significativamente más grandes que aquellos que han sido tratados con vehículo. El efecto de la 1,25(OH)₂D₃ es especialmente evidente en los fibroblastos NIH3T3.

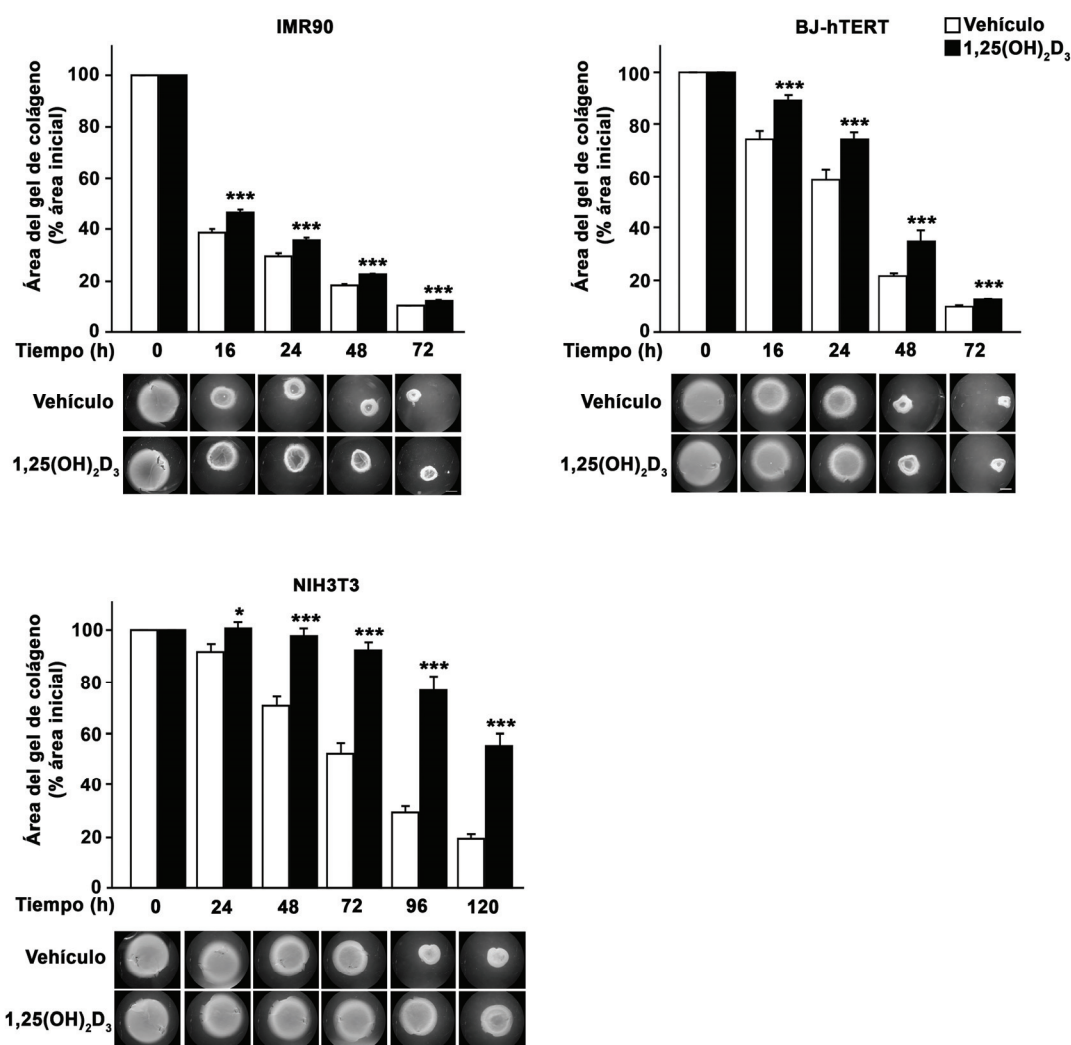


Figura 12. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la capacidad de contraer geles de colágeno de fibroblastos de diferentes orígenes. Los fibroblastos se embebieron en geles de colágeno en presencia de 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo y el área del gel de colágeno se midió a los tiempos indicados como se detalla en Materiales y Métodos. Para cada tipo celular se incluyen imágenes de un experimento representativo mostrando la apariencia de los geles de colágeno a cada tiempo (abajo) y la cuantificación (media ± SEM) de tres experimentos independientes (arriba). Barras de escala, 400 μm.

2. Efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal

2.1. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal

A la vista de los resultados obtenidos con las líneas celulares establecidas de fibroblastos indicando su sensibilidad a 1,25(OH)₂D₃ y las diversas acciones de probable relevancia en tumorigénesis que la 1,25(OH)₂D₃ ejerce en dichas células, establecimos cultivos primarios de NFs y CAFs de colon humano a partir de biopsias frescas de tejido tumoral y de mucosa colónica normal de 32 pacientes con CRC sometidos a cirugía en el Hospital Universitario La Paz siguiendo la técnica de crecimiento a partir de

explante descrita en Materiales y Métodos (**Figura 13**). Las características clinicopatológicas de los 32 pacientes se detallan en la **Tabla 1**.

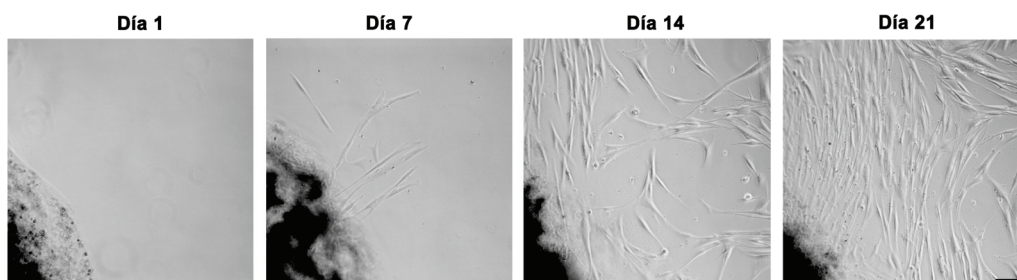


Figura 13. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos a partir de biopsias de pacientes con CRC. Imágenes de microscopía de contraste de fases que muestran el establecimiento de un cultivo primario de fibroblastos de colon mediante la técnica de crecimiento a partir de explante. Se observa cómo los fibroblastos migran hacia el exterior del fragmento de tejido (explante) y crecen a su alrededor. A las 3 semanas aproximadamente (cuando el explante está rodeado de fibroblastos), se retira el tejido y se recuperan los fibroblastos por tripsinización, que posteriormente se amplifican y se utilizan para los experimentos. Barra de escala, 100 μ m.

Tabla 1. Características clinicopatológicas de los pacientes con CRC a partir de cuyas biopsias se establecieron los cultivos primarios de NFs y CAFs.

Paciente	Género	Edad	Localización del tumor	Grado de diferenciación del tumor	Estadio AJCC ¹	Metástasis en nódulos linfáticos	Metástasis distantes
9	Mujer	84	Colon derecho	Moderado	II	Negativo	Negativo
11	Hombre	60	Colon izquierdo	Poco	II	Negativo	Negativo
16	Mujer	77	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
17	Mujer	49	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
20	Hombre	80	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
23	Hombre	87	Colon derecho	Moderado	IV	Negativo	Positivo
24	Mujer	58	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
25	Hombre	81	Colon izquierdo	Poco	III	Positivo	Negativo
27	Mujer	55	Colon derecho	Moderado	III	Positivo	Negativo
28	Hombre	58	Colon derecho	Moderado	IV	Positivo	Positivo
29	Hombre	86	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
30	Hombre	81	Colon izquierdo	Moderado	III	Positivo	Negativo
34	Hombre	76	Colon derecho	Moderado	II	Negativo	Negativo
35	Hombre	70	Colon derecho	Moderado	II	Negativo	Negativo
36	Hombre	68	Colon derecho	Moderado	II	Negativo	Negativo
38	Hombre	58	Colon derecho	Moderado	III	Positivo	Negativo
42	Mujer	80	Colon izquierdo	Poco	III	Positivo	Negativo
43	Mujer	47	Colon derecho	Moderado	IV	Positivo	Positivo
44	Mujer	68	Colon izquierdo	Moderado	III	Positivo	Negativo
45	Hombre	75	Colon izquierdo	Moderado	I	Negativo	Negativo
46	Mujer	76	Colon derecho	Moderado	II	Negativo	Negativo
47	Mujer	77	Colon derecho	Poco	II	Negativo	Negativo
48	Hombre	83	Colon izquierdo	Moderado	IV	Positivo	Positivo
49	Hombre	60	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
50	Hombre	72	Colon izquierdo	Poco	IV	Positivo	Positivo
51	Hombre	84	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
52	Mujer	83	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
53	Hombre	81	Colon izquierdo	Moderado	II	Negativo	Negativo
54	Hombre	47	Colon izquierdo	Moderado	III	Positivo	Negativo
55	Hombre	63	Colon izquierdo	Moderado	III	Positivo	Negativo
56	Mujer	82	Colon izquierdo	Moderado	IV	Negativo	Positivo
58	Mujer	86	Colon izquierdo	Moderado	I	Negativo	Negativo

¹Para detalles, véase Materiales y Métodos.

En todos los casos, confirmamos la pureza de los cultivos primarios (ausencia de contaminación con células de origen epitelial) analizando la expresión en los mismos de marcadores de fibroblastos (vimentina y α -SMA) y la ausencia de expresión de marcadores epiteliales (citoqueratina-18 y E-cadherina) (**Figura 14**).

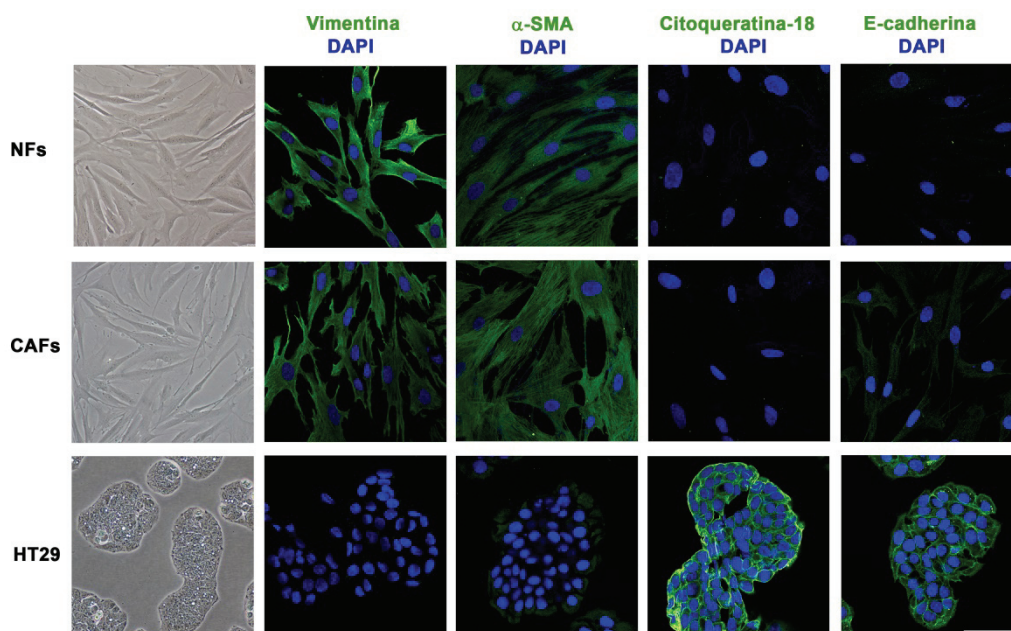


Figura 14. Caracterización fenotípica de los cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con CRC. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases y de inmunofluorescencia de una pareja de cultivos primarios de NFs y CAFs mostrando la morfología celular, la expresión de marcadores de fibroblastos (vimentina y α -SMA), y la ausencia de expresión de marcadores de células epiteliales (citoqueratina-18 y E-cadherina). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI. Las células de carcinoma de colon HT29 tienen un origen epitelial y se utilizaron como control. Barras de escala, 60 μ m.

2.2. Los cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a tumores derivados de pacientes con cáncer colorrectal expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

En primer lugar estudiamos la expresión de VDR en los 32 cultivos primarios de NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC. Todos los cultivos primarios analizados expresan RNA de *VDR*, existiendo una diferencia entre los fibroblastos con mayor y menor expresión de 4 veces en NFs y de 9 veces en CAFs (**Figura 15A**). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *VDR* entre NFs y CAFs. Al igual que se observa en las líneas celulares establecidas de fibroblastos, el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementa la expresión de RNA de *VDR* en los cultivos primarios de NFs y CAFs (**Figura 15B**). A continuación, comparamos los niveles de expresión de *VDR* de los fibroblastos primarios y de las líneas celulares de fibroblastos con los de líneas celulares de distintos orígenes que responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y tejidos que expresan altos (intestino delgado, colon, riñón) o bajos (músculo esquelético, corazón, hígado) niveles de VDR [89, 120, 247, 254, 255] (**Tabla 2**). En términos generales, la expresión de *VDR* de los fibroblastos primarios de colon es similar a la de las líneas celulares establecidas de fibroblastos y también a la observada en las células THP1, CACO2 y HCT116,

y en tejidos diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como el riñón y el colon. Por otro lado, dicha expresión es 10 veces superior aproximadamente a la detectada en los tejidos con baja expresión de VDR ([Tabla 2](#)).

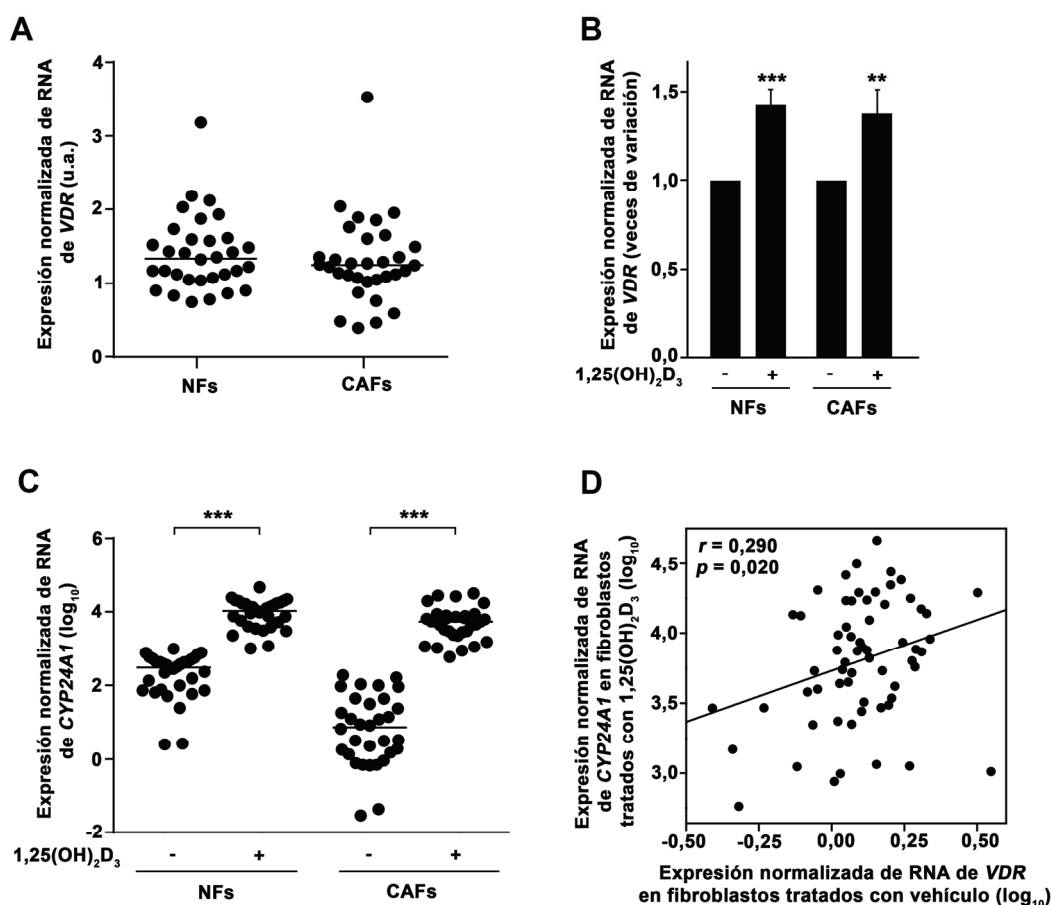


Figura 15. Los cultivos primarios de NFs y CAFs de colon expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (A) Análisis de la expresión de RNA de VDR mediante RT-qPCR en 32 cultivos primarios de NFs y CAFs de colon humano. Los datos se normalizaron frente a la expresión de los genes constitutivos *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0* según se indica en Materiales y Métodos, y los resultados se muestran con respecto a la expresión obtenida en la línea celular de fibroblastos normales de colon humano CCD18Co. Las líneas horizontales representan la mediana. (B) Análisis de la expresión de RNA de VDR mediante RT-qPCR en los mismos fibroblastos que en (A) tratados con 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo durante 48 h. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión de los genes constitutivos *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0*, y se muestra la media \pm SEM de las veces de variación tras el tratamiento. (C) Análisis de la expresión de RNA de *CYP24A1* mediante RT-qPCR en los mismos cultivos primarios que en (A) tratados durante 48 h con 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión de los genes constitutivos *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0*, y los resultados se muestran con respecto a la expresión obtenida en los fibroblastos CCD18Co. Las líneas horizontales indican la mediana. (D) Correlación entre la expresión de RNA de VDR en los 32 cultivos primarios de NFs y CAFs tratados con vehículo durante 48 h y la expresión de RNA de *CYP24A1* en las mismas células tratadas con 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durante 48 h.

Posteriormente analizamos el efecto del tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la expresión de RNA de su gen diana *CYP24A1*. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce de manera significativa la expresión de este gen en NFs y en CAFs ([Figura 15C](#)), aunque la magnitud de la inducción es muy variable dependiendo del cultivo primario analizado, con un rango de entre 3 y 9.030 veces de inducción en NFs (mediana: 43 veces), y de entre 6 y 161.857 veces de inducción en CAFs (mediana: 803 veces). Aunque estos datos sugieren que la inducción de *CYP24A1* por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es mayor en los CAFs que en los NFs, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($p = 0,098$). Asimismo, observamos que existe una

correlación directa entre la expresión de *VDR* en los fibroblastos tratados con vehículo y los niveles de expresión de *CYP24A1* de dichos fibroblastos tras el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Figura 15D).

Tabla 2. Expresión de RNA de *VDR* en diversas células en cultivo y tejidos humanos. La expresión de RNA de *VDR* se analizó por RT-qPCR y se normalizó frente a los genes constitutivos *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0* según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran con respecto a la expresión obtenida en la línea celular de fibroblastos normales de colon humano CCD18Co.

Cultivos celulares / Tejidos	Expresión normalizada de RNA de <i>VDR</i> (u.a.)
Cultivos celulares	
Fibroblastos de colon CCD18Co	1,00
Cultivos primarios de NFs de colon	0,74-3,18 (mediana: 1,34)
Cultivos primarios de CAFs de colon	0,39-3,53 (mediana: 1,25)
Fibroblastos de pulmón IMR90	0,48
Fibroblastos de piel BJ-hTERT	2,34
Células de leucemia monocítica THP1	0,82
Células de carcinoma de colon CACO2	3,17
Células de carcinoma de colon HCT116	3,57
Células de carcinoma de colon SW480-ADH	6,28
Células de carcinoma de mama MCF7	6,67
Tejidos	
Músculo esquelético	0,05
Corazón	0,13
Hígado	0,13
Riñón	1,31
Colon	2,69
Intestino delgado	4,93

2.3. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe las acciones protumorales de los fibroblastos primarios derivados de pacientes con cáncer colorrectal

Después de analizar la expresión de *VDR* y la sensibilidad a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de NFs y CAFs, estudiamos los efectos de ésta sobre dos propiedades de los fibroblastos que se potencian durante su activación en el entorno tumoral y que a su vez contribuyen a la progresión del cáncer: la habilidad para contraer la ECM y la capacidad para promover la migración de las células de carcinoma [13, 95, 165, 198, 214, 252].

Para evaluar el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la habilidad de los fibroblastos para contraer la ECM realizamos ensayos de contracción de geles de colágeno con 10 cultivos primarios pareados (procedentes del mismo paciente) de NFs y CAFs (Figura 16). Observamos que en todos los casos, excepto en los ensayos realizados con los CAFs del paciente 44, los geles de colágeno conteniendo fibroblastos y tratados durante 72 h con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eran más grandes que los que tratados con vehículo, aunque la potencia del efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ varía entre pacientes (Figura 16B). El análisis global de los resultados obtenidos con los cultivos primarios de los 10 pacientes indica que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe de forma significativa la capacidad de los NFs y de los CAFs de contraer los geles

de colágeno, aunque el efecto inhibitorio de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es significativamente mayor en los NFs (Figura 16C).

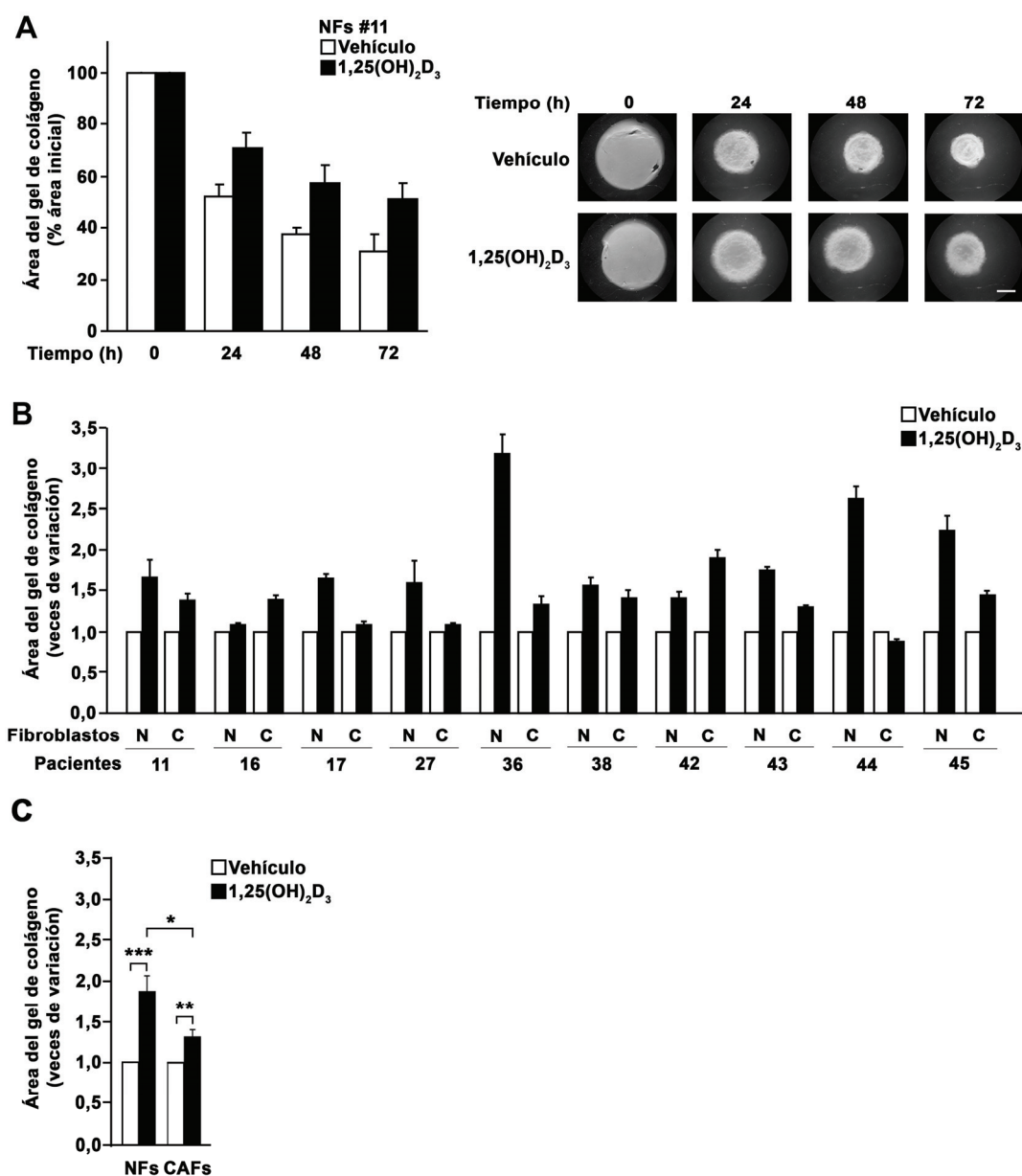


Figura 16. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la capacidad de NFs y CAFs de contraer geles de colágeno. (A) Ensayo representativo de contracción de geles de colágeno por fibroblastos primarios. Los NFs del paciente 11 se embebieron en geles de colágeno en presencia de 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo y el área de los geles se midió a los tiempos indicados. Se muestran imágenes de los geles de colágeno a cada tiempo (derecha) y la cuantificación de su área (izquierda). El experimento se llevó a cabo por triplicado y se muestra la media \pm SD. Barra de escala, 400 μm . (B) Ensayo de contracción de geles de colágeno en 10 cultivos primarios pareados de NFs (N) y CAFs (C) en presencia de 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o vehículo. Los ensayos se realizaron por triplicado y se muestra la media \pm SD del efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre el área del gel (veces de variación con respecto a los geles de colágeno tratados con vehículo) tras 72 h de tratamiento. (C) Media \pm SEM de los resultados mostrados en (B).

En segundo lugar, analizamos el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la capacidad de 11 cultivos primarios pareados de NFs y CAFs de promover paracrinamente la migración de las células de carcinoma de colon SW480-ADH en ensayos de cocultivo empleando insertos de tipo *Transwell* (Figura 17). Observamos que en todos los casos, excepto en los ensayos realizados con los NFs del paciente 11, las células SW480-ADH cocultivadas con fibroblastos pretratados durante 48 h con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ migraron menos que aquellas que habían sido cocultivadas con fibroblastos pretratados con vehículo, aunque la potencia del efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ varía entre pacientes (Figura 17B). El análisis global de los resultados obtenidos con los cultivos primarios de los 11 pacientes indica que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe de forma significativa la capacidad de los NFs y de los CAFs de promover la migración de las células de carcinoma de colon, aunque en este caso no se encontraron diferencias significativas en la intensidad del efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entre NFs y CAFs (Figura 17C).

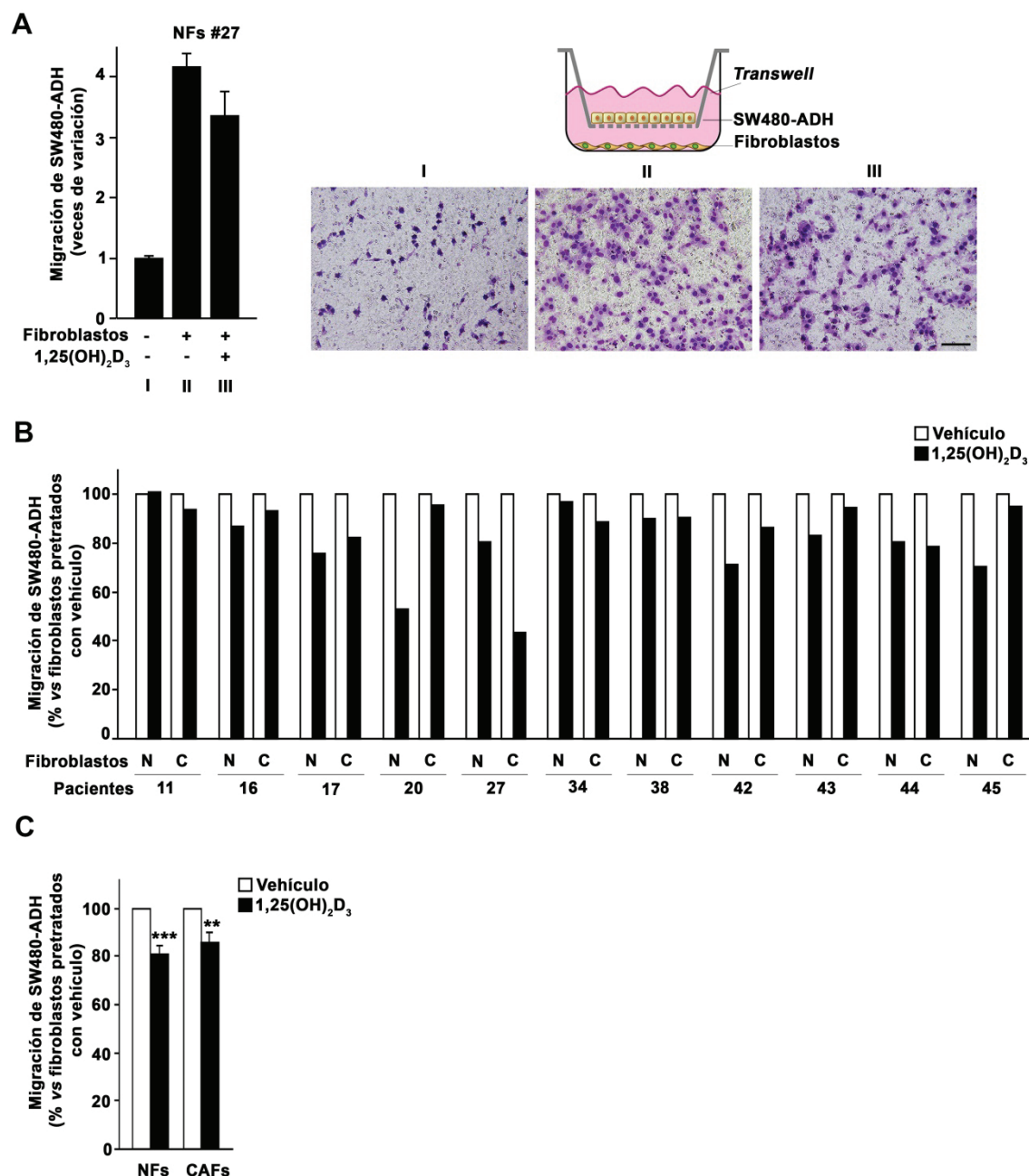


Figura 17. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe la acción promigratoria que los NFs y los CAFs ejercen sobre las células de carcinoma de colon. (A) Ensayo representativo de migración de células SW480-ADH cocultivadas con fibroblastos primarios utilizando insertos de tipo *Transwell* con poros de 8 μ m. La migración de las células SW480-ADH se analizó tras 24 h de cocultivo con NFs del paciente 27 pretratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Se muestra un esquema del dispositivo experimental (derecha arriba), imágenes representativas de las células que han migrado y se localizan en la superficie inferior de los insertos (derecha abajo), y la cuantificación de dichas células (izquierda). El experimento se realizó por triplicado y se representa la media \pm SD. Se utilizaron insertos sin fibroblastos como control. Barra de escala, 100 μ m. (B) Análisis de la acción promigratoria sobre células SW480-ADH de 11 cultivos primarios pareados de NFs (N) y CAFs (C) pretratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la migración de las células SW480-ADH que han sido cocultivadas con fibroblastos pretratados con vehículo. (C) Media \pm SEM de los resultados mostrados en (B).

2.4. Efecto de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la expresión génica de fibroblastos normales y asociados a tumores procedentes de pacientes con cáncer colorrectal

Como se ha comentado en la Introducción, la 1,25(OH)₂D₃ es un importante regulador de la expresión génica en el organismo. Con objeto de caracterizar el efecto de la 1,25(OH)₂D₃ sobre el patrón de expresión génica de los fibroblastos primarios de colon humano y así identificar genes implicados en las acciones de la 1,25(OH)₂D₃ en dichas células, realizamos un análisis de la expresión génica global mediante *microarrays* en 7 cultivos primarios pareados de NFs y CAFs tratados con 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Los resultados obtenidos indican que la 1,25(OH)₂D₃ modula de forma estadísticamente significativa (FDR < 0,05) la expresión de 958 genes en los NFs (47% inducidos y 53% reprimidos) y de 1.489 genes en los CAFs (35% inducidos y 65% reprimidos). La **Figura 18A** muestra los mapas de calor (*heat maps*) con los 100 genes más regulados (FDR < 0,05 y las mayores veces de variación) por 1,25(OH)₂D₃ en cada tipo de fibroblastos, y las **Tablas 3 y 4** detallan los resultados obtenidos para los 50 genes más regulados por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs, respectivamente.

La comparación entre los genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs muestra que el 21% de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en este estudio se regulan en ambos tipos de fibroblastos, mientras que el 26% y el 53% están regulados por 1,25(OH)₂D₃ solo en NFs o en CAFs, respectivamente (**Figura 18B**).

A continuación, estudiamos mediante RT-qPCR y en cultivos primarios procedentes de 7 pacientes distintos la expresión de 10 genes diana de 1,25(OH)₂D₃ (**Tabla 5**) identificados en el análisis de expresión génica global: 5 genes inducidos (*CHRD11*, *NID2*, *SEMA3B*, *TIMP3* y *CD82*) y 5 genes reprimidos (*CCL11*, *CCL13*, *S100A4*, *CYTL1* y *CCL2*). Este ensayo mostró que todos ellos se regulan de forma estadísticamente significativa por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs (**Figura 19**), aunque con ciertas variaciones en la intensidad del efecto de la 1,25(OH)₂D₃ respecto a los resultados obtenidos en el estudio de *microarrays*. Además, no encontramos diferencias significativas en la regulación de estos genes por 1,25(OH)₂D₃ entre ambos tipos de fibroblastos, excepto en el caso de *CCL11*, cuya inhibición por 1,25(OH)₂D₃ es significativamente mayor en los NFs ($p = 0,034$).

El análisis de los resultados de los *microarrays* nos permitió también identificar que 34 genes se expresan diferencialmente (FDR < 0,05) entre NFs y CAFs (el 44% y el 56% tienen mayor y menor expresión en los CAFs que en los NFs, respectivamente) (**Tabla 6**). El número de genes diferencialmente expresados se incrementa a 172 (el 28% y el 72% tienen mayor y menor expresión en los CAFs que en los NFs, respectivamente) si utilizamos un FDR menos restrictivo (FDR < 0,1). Al no ser éste un objetivo de esta Tesis Doctoral, no profundizamos más en dichos genes, que podrían ser objeto de futuros estudios.

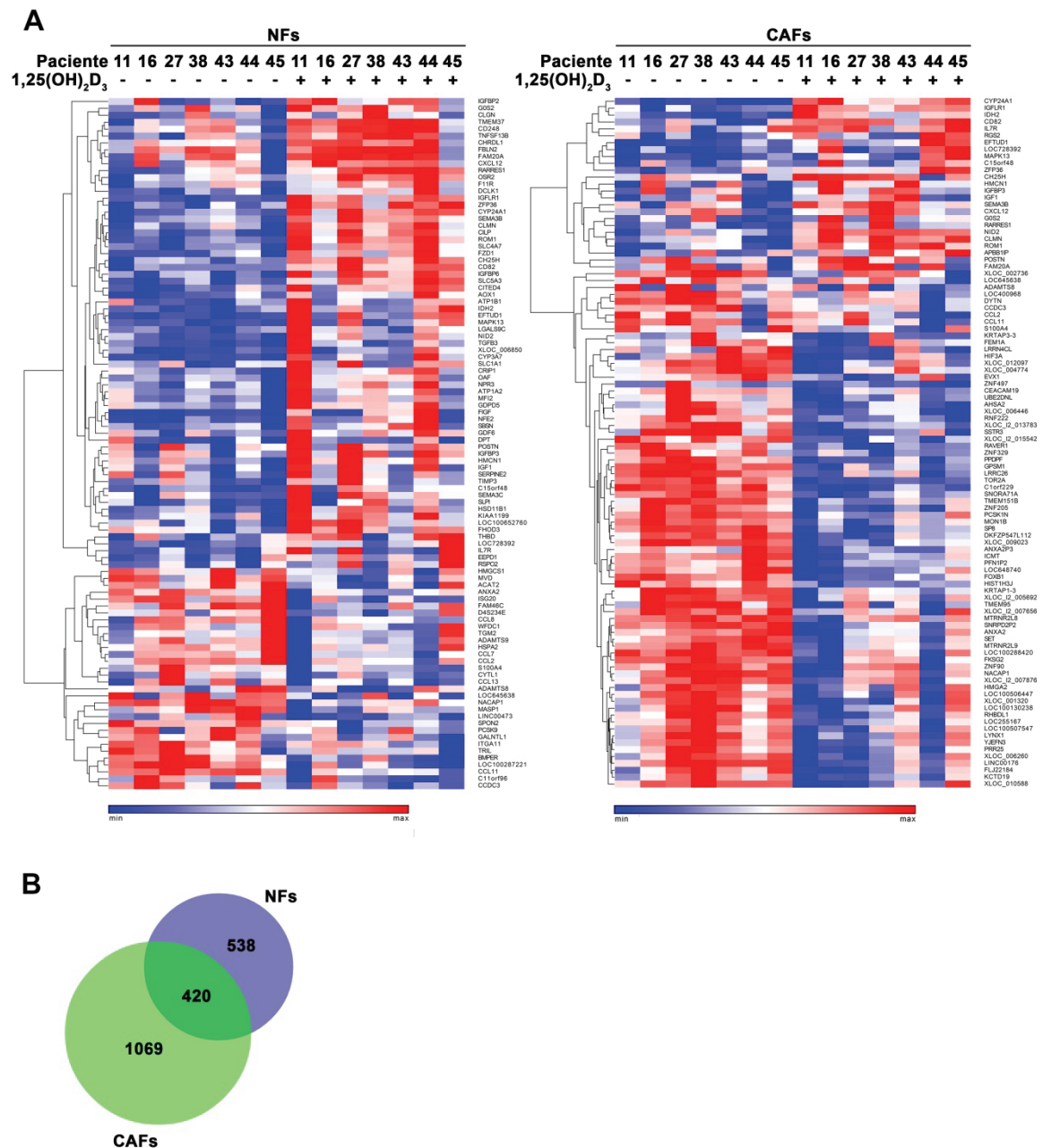


Figura 18. La 1,25(OH)₂D₃ regula la expresión génica de NFs y CAFs de colon humano. (A) Mapas de calor (*heat maps*) que muestran los 100 genes más regulados (FDR < 0,05 y las mayores veces de variación) por 1,25(OH)₂D₃ en NFs (izquierda) y en CAFs (derecha) identificados en el análisis de la expresión génica global. Se analizó RNA procedente de 7 cultivos primarios pareados de NFs y CAFs tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. **(B)** Diagrama de Venn que refleja el solapamiento entre los genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs identificados en el estudio de *microarrays*. El número de genes incluidos en cada subgrupo se indica en el diagrama

Tabla 3. Lista de los 50 genes más regulados (FDR < 0,05 y las mayores veces de variación) por 1,25(OH)₂D₃ en NFs de colon humano identificados en el estudio de expresión génica global. Se analizó RNA procedente de 7 cultivos primarios de NFs tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h.

Gen		Veces de variación (log ₂)	FDR ¹
CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	4,046	0,003
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	3,104	0,001
CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase	3,079	0,003
IGFLR1	IGF-like family receptor 1	2,353	0,001
CHRD1	chordin-like 1	1,660	0,001
CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	1,586	0,007
TMEM37	transmembrane protein 37	1,566	0,005
EFTUD1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	1,563	0,005
OSR2	odd-skipped related 2 (Drosophila)	1,562	0,004
NPR3	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	1,533	0,002
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	1,531	0,002
G0S2	G0/G1switch 2	1,529	0,030
ATP1A2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	1,492	0,004
ROM1	retinal outer segment membrane protein 1	1,460	0,002
NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	1,440	0,003
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	1,434	0,002
CD82	CD82 molecule	1,424	0,002
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	1,419	0,006
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	1,404	0,001
HMCN1	hemicentin 1	1,367	0,001
FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	1,366	0,022
SEMA3B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	1,366	0,004
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	1,336	0,007
XLOC_006850	BROAD Institute lincRNA (XLOC_006850), lincRNA [TCONS_00014769]	1,324	0,006
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	1,303	0,009
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP ⁺), mitochondrial	1,301	0,007
CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	1,283	0,006
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,281	0,018
LOC100652760	uncharacterized LOC100652760	1,257	0,003
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	1,249	0,003
OAF	OAF homolog (Drosophila)	1,230	0,013
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	1,221	0,006
ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	1,188	0,002
HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	1,159	0,007
CD248	CD248 molecule, endosialin	1,119	0,003
RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	1,091	0,001
THBD	thrombomodulin	1,086	0,024
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	1,051	0,001
LOC728392	uncharacterized LOC728392	1,050	0,006
FBLN2	fibulin 2	1,035	0,002
SBSN	suprabasin	1,022	0,002
TRIL	TLR4 interactor with leucine-rich repeats	-1,039	0,033
ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9	-1,061	0,005
S100A4	S100 calcium binding protein A4	-1,121	0,002
LOC100287221	uncharacterized LOC100287221	-1,139	0,002
CYT11	cytokine-like 1	-1,181	0,002
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-1,246	0,003
CCL13	chemokine (C-C motif) ligand 13	-1,324	0,007
CCDC3	coiled-coil domain containing 3	-1,919	0,003
CCL11	chemokine (C-C motif) ligand 11	-2,558	0,002

¹Benjamini & Hochberg False Discovery Rate.

Tabla 4. Lista de los 50 genes más regulados (FDR < 0,05 y las mayores veces de variación) por 1,25(OH)₂D₃ en CAFs de colon humano identificados en el estudio de expresión génica global. Se analizó RNA procedente de 7 cultivos primarios de CAFs tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h.

Gen		Veces de variación (log ₂)	FDR ¹
CYP24A1	<i>cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1</i>	4,904	0,000
IGFLR1	<i>IGF-like family receptor 1</i>	1,765	0,000
CH25H	<i>cholesterol 25-hydroxylase</i>	1,646	0,002
IDH2	<i>isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial</i>	1,590	0,000
EFTUD1	<i>elongation factor Tu GTP binding domain containing 1</i>	1,577	0,001
IGFBP3	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>	1,542	0,000
NID2	<i>nidogen 2 (osteonidogen)</i>	1,459	0,001
G0S2	<i>G0/G1switch 2</i>	1,407	0,007
SEMA3B	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B</i>	1,343	0,001
HMCN1	<i>hemicentin 1</i>	1,291	0,001
IL7R	<i>interleukin 7 receptor</i>	1,258	0,001
CLMN	<i>calmin (calponin-like, transmembrane)</i>	1,240	0,002
CXCL12	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>	1,211	0,002
LOC728392	<i>uncharacterized LOC728392</i>	1,168	0,006
POSTN	<i>periostin, osteoblast specific factor</i>	1,138	0,003
PFN1P2	<i>profilin 1 pseudogene 2</i>	-1,098	0,002
LOC100288420	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa pseudogene</i>	-1,108	0,002
LOC648740	<i>actin, gamma 2, smooth muscle, enteric pseudogene</i>	-1,111	0,001
HIST1H3J	<i>histone cluster 1, H3j</i>	-1,117	0,001
XLOC_I2_007656	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_I2_007656), lincRNA [TCONS_I2_00014098]</i>	-1,124	0,002
RHBDL1	<i>rhomboid, veinlet-like 1 (Drosophila)</i>	-1,128	0,001
LOC255167	<i>uncharacterized LOC255167</i>	-1,131	0,001
LOC100506447	<i>uncharacterized protein LOC100506447</i>	-1,142	0,010
FKSG2	<i>tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene</i>	-1,148	0,002
FLJ22184	<i>putative uncharacterized protein FLJ22184</i>	-1,157	0,003
ZNF90	<i>zinc finger protein 90</i>	-1,157	0,003
XLOC_004774	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_004774), lincRNA [TCONS_00009634]</i>	-1,166	0,001
PRR25	<i>proline rich 25</i>	-1,167	0,002
SNORA71A	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 71A</i>	-1,193	0,001
XLOC_006260	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_006260), lincRNA [TCONS_00013082]</i>	-1,201	0,004
YJEFN3	<i>YjeF N-terminal domain containing 3</i>	-1,211	0,003
RNF222	<i>ring finger protein 222</i>	-1,216	0,001
XLOC_001320	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_001320), lincRNA [TCONS_00003548]</i>	-1,228	0,004
ZNF205	<i>zinc finger protein 205</i>	-1,230	0,002
C1orf229	<i>chromosome 1 open reading frame 229</i>	-1,231	0,001
TMEM95	<i>transmembrane protein 95</i>	-1,240	0,002
DKFZP547L112	<i>uncharacterized protein DKFZp547L112</i>	-1,258	0,001
XLOC_009023	<i>long intergenic non-protein coding RNA 1150</i>	-1,346	0,001
PCSK1N	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor</i>	-1,354	0,002
LINC00176	<i>long intergenic non-protein coding RNA 176</i>	-1,359	0,001
MTRNR2L9	<i>MT-RNR2-like 9 (pseudogene)</i>	-1,374	0,001
NACAP1	<i>nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1</i>	-1,378	0,001
KCTD19	<i>potassium channel tetramerisation domain containing 19</i>	-1,387	0,001
XLOC_I2_007876	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_I2_007876), lincRNA [TCONS_I2_00015692]</i>	-1,411	0,002
CCDC3	<i>coiled-coil domain containing 3</i>	-1,418	0,001
XLOC_010588	<i>BROAD Institute lincRNA (XLOC_010588), lincRNA [TCONS_00022267]</i>	-1,523	0,004
SSTR3	<i>somatostatin receptor 3</i>	-1,552	0,009
FOXB1	<i>forkhead box B1</i>	-1,556	0,002
ANXA2	<i>annexin A2</i>	-1,600	0,001
CCL11	<i>chemokine (C-C motif) ligand 11</i>	-1,890	0,004

¹Benjamini & Hochberg False Discovery Rate.

Tabla 5. Lista de genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y CAFs de colon humano identificados en el estudio de expresión génica global y candidatos para la validación mediante RT-qPCR.

Gen		NFs		CAFs	
		Veces de variación (log ₂)	FDR ¹	Veces de variación (log ₂)	FDR
CHRD11	<i>chordin-like 1</i>	1,660	0,001	0,901	0,003
NID2	<i>nidogen 2 (osteonidogen)</i>	1,440	0,003	1,459	0,001
SEMA3B	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B</i>	1,366	0,004	1,343	0,001
TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>	1,221	0,006	0,633	0,002
CD82	<i>CD82 molecule</i>	1,424	0,002	1,066	0,001
CCL11	<i>chemokine (C-C motif) ligand 11</i>	-2,558	0,002	-1,890	0,004
CCL13	<i>chemokine (C-C motif) ligand 13</i>	-1,324	0,007	-0,332	0,012
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>	-1,121	0,002	-1,053	0,000
CYTL1	<i>cytokine-like 1</i>	-1,181	0,002	-0,533	0,004
CCL2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	-1,246	0,003	-0,941	0,036

¹Benjamini & Hochberg False Discovery Rate.

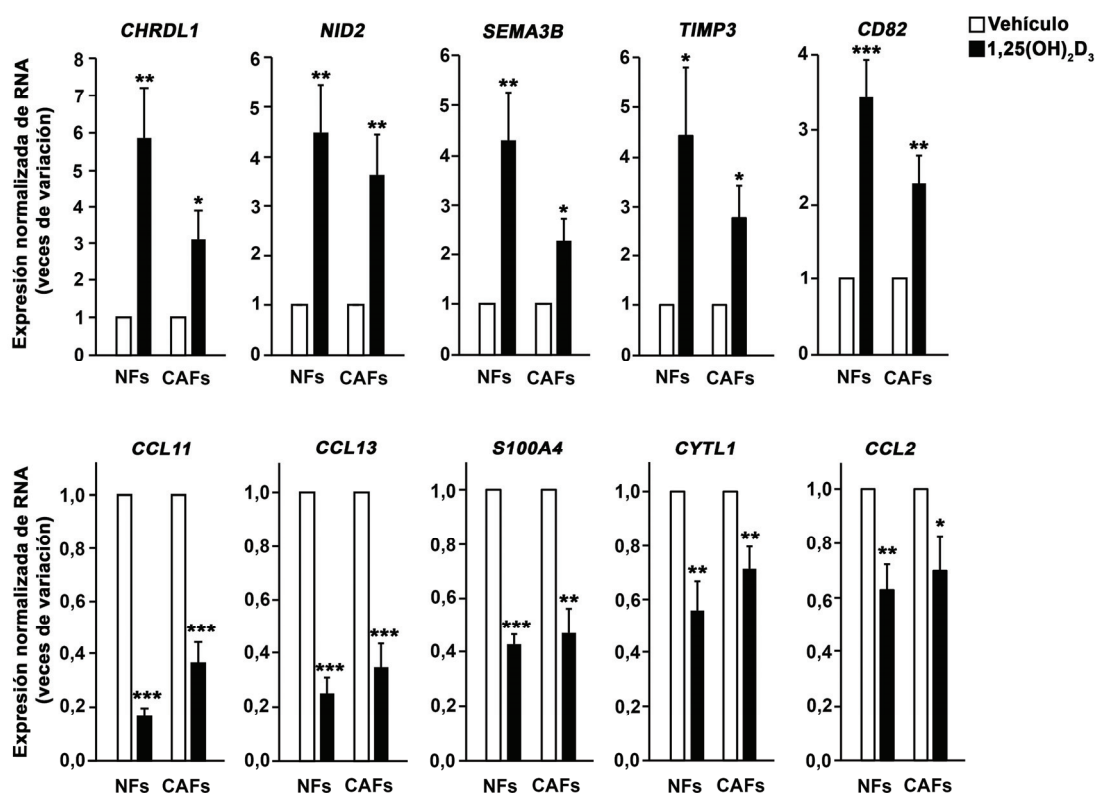


Figura 19. Validación por RT-qPCR de una selección de genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en el estudio de expresión génica global. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de RNA de 10 genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en el estudio de *microarrays* en 7 cultivos primarios pareados de NFs y CAFs tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Estos cultivos primarios derivan de pacientes diferentes (pacientes 9, 17, 20, 24, 25, 34 y 35) a los utilizados en el estudio de expresión génica global. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión de los genes constitutivos *GAPDH*, *B2M* y *RPLP0* según se indica en Materiales y Métodos, y se muestra la media ± SEM de las veces de variación tras el tratamiento.

Tabla 6. Lista de los genes diferencialmente expresados (FDR < 0,05) entre NFs y CAFs de colon humano identificados en el estudio de expresión génica global. Se analizó RNA procedente de 7 cultivos primarios pareados de NFs y CAFs.

Gen		Veces de variación (log ₂) ¹	FDR ²
CADM1	<i>cell adhesion molecule 1</i>	2,286	0,049
SOX11	<i>SRY (sex determining region Y)-box 11</i>	2,068	0,049
C1orf133	<i>chromosome 1 open reading frame 133</i>	2,056	0,049
NTF3	<i>neurotrophin 3</i>	2,010	0,049
NLGN4X	<i>neuroligin 4, X-linked</i>	2,005	0,049
IL7R	<i>interleukin 7 receptor</i>	1,889	0,049
INHBA	<i>inhibin, beta A</i>	1,788	0,049
RUNX3	<i>runt-related transcription factor 3</i>	1,694	0,049
NFE2L3	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3</i>	1,571	0,049
LOC643650	<i>uncharacterized LOC643650</i>	1,124	0,049
TIAM2	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 2</i>	1,099	0,049
KIAA1462	<i>KIAA1462</i>	1,081	0,049
FAM60A	<i>family with sequence similarity 60, member A</i>	0,963	0,049
LIMS3-LOC440895	<i>LIMS3-LOC440895 readthrough</i>	0,942	0,049
MIR4435-2HG	<i>MIR4435-2 host gene</i>	0,855	0,049
TMEM170B	<i>transmembrane protein 170B</i>	-0,878	0,049
TBC1D12	<i>TBC1 domain family, member 12</i>	-0,895	0,049
LGMN	<i>legumain</i>	-0,906	0,049
DPYD	<i>dihydropyrimidine dehydrogenase</i>	-0,944	0,049
GCH1	<i>GTP cyclohydrolase 1</i>	-0,953	0,049
ANGPTL2	<i>angiopoietin-like 2</i>	-0,972	0,049
LYNX1	<i>Ly6/neurotoxin 1</i>	-1,079	0,049
ADAM33	<i>ADAM metalloproteinase domain 33</i>	-1,117	0,049
ADCY4	<i>adenylate cyclase 4</i>	-1,219	0,049
PBX1	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>	-1,248	0,049
ITGB8	<i>integrin, beta 8</i>	-1,437	0,049
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>	-1,457	0,049
NFASC	<i>neurofascin</i>	-1,644	0,049
CACNB2	<i>calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit</i>	-1,648	0,049
METTL7A	<i>methyltransferase like 7A</i>	-1,657	0,049
LOC100506582	<i>uncharacterized LOC100506582</i>	-1,929	0,049
RSPO3	<i>R-spondin 3</i>	-2,006	0,049
IL33	<i>interleukin 33</i>	-2,763	0,049
SMOC2	<i>SPARC related modular calcium binding 2</i>	-3,436	0,049

¹Los valores positivos y negativos corresponden a los genes sobreexpresados y reprimidos, respectivamente, en los CAFs con respecto a los NFs; ²Benjamini & Hochberg False Discovery Rate.

Para determinar las principales funciones biológicas en las que están implicados los genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos primarios, llevamos a cabo un estudio de enriquecimiento funcional utilizando el programa DAVID para identificar los términos de ontología génica (GO) de las categorías proceso biológico (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF) que están significativamente enriquecidos (FDR < 0,05) en dichos genes diana. Las **Tablas 7-10** muestran los términos significativamente enriquecidos. Los resultados indican que los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ están preferentemente implicados en funciones como adhesión y diferenciación celular, migración, proliferación celular y apoptosis, organización de la ECM, formación de vasos sanguíneos, cicatrización de heridas y respuesta inflamatoria e inmune. Además, la mayoría de los términos GO de la categoría CC que se encuentran enriquecidos están relacionados con la región extracelular.

Tabla 7. Resultados del análisis de enriquecimiento funcional de los genes inducidos por 1,25(OH)₂D₃ en NFs de colon humano.

Categoría	Término	Nº ¹	% ²	Enriq. ³	FDR ⁴
BP ⁵	GO:0065008~ <i>regulation of biological quality</i>	65	15,815	1,958	2,61E-06
BP	GO:0001501~ <i>skeletal system development</i>	24	5,839	3,329	1,64E-05
BP	GO:0009605~ <i>response to external stimulus</i>	44	10,706	2,130	5,90E-05
BP	GO:0048731~ <i>system development</i>	84	20,438	1,595	1,32E-04
BP	GO:0042221~ <i>response to chemical stimulus</i>	54	13,139	1,865	1,70E-04
BP	GO:0035295~ <i>tube development</i>	18	4,380	3,621	1,79E-04
BP	GO:0033273~ <i>response to vitamin</i>	10	2,433	6,705	2,78E-04
BP	GO:0048856~ <i>anatomical structure development</i>	88	21,411	1,541	2,84E-04
BP	GO:0007584~ <i>response to nutrient</i>	14	3,406	4,425	2,89E-04
BP	GO:0050793~ <i>regulation of developmental process</i>	34	8,273	2,232	4,04E-04
BP	GO:0007275~ <i>multicellular organismal development</i>	96	23,358	1,483	4,62E-04
BP	GO:0031667~ <i>response to nutrient levels</i>	16	3,893	3,594	7,09E-04
BP	GO:0032502~ <i>developmental process</i>	102	24,818	1,434	9,09E-04
BP	GO:0001503~ <i>ossification</i>	12	2,920	4,617	9,83E-04
BP	GO:0051302~ <i>regulation of cell division</i>	8	1,946	7,532	1,39E-03
BP	GO:0048754~ <i>branching morphogenesis of a tube</i>	9	2,190	6,127	1,75E-03
BP	GO:0060348~ <i>bone development</i>	12	2,920	4,317	1,81E-03
BP	GO:0009991~ <i>response to extracellular stimulus</i>	16	3,893	3,218	2,46E-03
BP	GO:0048513~ <i>organ development</i>	63	15,328	1,604	2,49E-03
BP	GO:0030001~ <i>metal ion transport</i>	25	6,083	2,379	2,49E-03
BP	GO:0009611~ <i>response to wounding</i>	27	6,569	2,254	2,97E-03
BP	GO:0006950~ <i>response to stress</i>	61	14,842	1,602	3,42E-03
BP	GO:0009653~ <i>anatomical structure morphogenesis</i>	47	11,436	1,737	4,08E-03
BP	GO:0001763~ <i>morphogenesis of a branching structure</i>	9	2,190	5,382	4,37E-03
BP	GO:0002320~ <i>lymphoid progenitor cell differentiation</i>	4	0,973	25,286	6,43E-03
BP	GO:0009888~ <i>tissue development</i>	30	7,299	1,996	9,03E-03
BP	GO:0032501~ <i>multicellular organismal process</i>	125	30,414	1,292	9,13E-03
BP	GO:0030198~ <i>extracellular matrix organization</i>	10	2,433	4,255	9,74E-03
BP	GO:0035239~ <i>tube morphogenesis</i>	11	2,676	3,833	1,03E-02
BP	GO:0006811~ <i>ion transport</i>	33	8,029	1,901	1,04E-02
BP	GO:0015674~ <i>di-, tri-valent inorganic cation transport</i>	13	3,163	3,269	1,12E-02
BP	GO:0010033~ <i>response to organic substance</i>	31	7,543	1,903	1,55E-02
BP	GO:0002252~ <i>immune effector process</i>	11	2,676	3,633	1,57E-02
BP	GO:0006928~ <i>cell motion</i>	23	5,596	2,143	2,01E-02
BP	GO:0042060~ <i>wound healing</i>	13	3,163	3,012	2,29E-02
BP	GO:0048878~ <i>chemical homeostasis</i>	24	5,839	2,074	2,30E-02
BP	GO:0060548~ <i>negative regulation of cell death</i>	19	4,623	2,335	2,37E-02
BP	GO:0002244~ <i>hemopoietic progenitor cell differentiation</i>	4	0,973	16,091	2,81E-02
BP	GO:0006812~ <i>cation transport</i>	25	6,083	2,000	2,89E-02
BP	GO:0009725~ <i>response to hormone stimulus</i>	19	4,623	2,291	2,93E-02
BP	GO:0001944~ <i>vasculature development</i>	15	3,650	2,644	2,93E-02
BP	GO:0051781~ <i>positive regulation of cell division</i>	6	1,460	6,808	2,96E-02
BP	GO:0030278~ <i>regulation of ossification</i>	8	1,946	4,539	3,18E-02
BP	GO:0045597~ <i>positive regulation of cell differentiation</i>	14	3,406	2,705	3,62E-02
BP	GO:0009719~ <i>response to endogenous stimulus</i>	20	4,866	2,185	3,63E-02
BP	GO:0008202~ <i>steroid metabolic process</i>	13	3,163	2,848	3,67E-02
BP	GO:0030154~ <i>cell differentiation</i>	55	13,382	1,487	4,27E-02
BP	GO:0006916~ <i>anti-apoptosis</i>	13	3,163	2,793	4,28E-02
BP	GO:0050896~ <i>response to stimulus</i>	102	24,818	1,289	4,72E-02
BP	GO:0043066~ <i>negative regulation of apoptosis</i>	18	4,380	2,250	4,81E-02
CC ⁶	GO:0044421~ <i>extracellular region part</i>	62	15,085	2,995	1,93E-13
CC	GO:0005576~ <i>extracellular region</i>	93	22,628	2,146	7,56E-12
CC	GO:0005615~ <i>extracellular space</i>	42	10,219	2,844	3,82E-08
CC	GO:0031012~ <i>extracellular matrix</i>	28	6,813	3,764	9,86E-08
CC	GO:0005578~ <i>proteinaceous extracellular matrix</i>	26	6,326	3,768	3,74E-07
CC	GO:0044420~ <i>extracellular matrix part</i>	13	3,163	5,153	1,07E-04
CC	GO:0031093~ <i>platelet alpha granule lumen</i>	7	1,703	7,918	2,95E-03
CC	GO:0042598~ <i>vesicular fraction</i>	16	3,893	3,041	3,52E-03
CC	GO:0005626~ <i>insoluble fraction</i>	35	8,516	1,935	3,88E-03

CC	GO:0005624~ <i>membrane fraction</i>	34	8,273	1,949	4,20E-03
CC	GO:0060205~ <i>cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen</i>	7	1,703	7,378	4,39E-03
CC	GO:0031983~ <i>vesicle lumen</i>	7	1,703	7,058	5,62E-03
CC	GO:0005792~ <i>microsome</i>	15	3,650	2,935	8,36E-03
CC	GO:0000267~ <i>cell fraction</i>	40	9,732	1,713	1,41E-02
CC	GO:0031091~ <i>platelet alpha granule</i>	7	1,703	5,797	1,62E-02
CC	GO:0030141~ <i>secretory granule</i>	12	2,920	3,092	2,35E-02
MF ⁷	GO:0008083~ <i>growth factor activity</i>	14	3,406	4,015	7,04E-04
MF	GO:0005520~ <i>insulin-like growth factor binding</i>	6	1,460	11,080	2,51E-03
MF	GO:0005509~ <i>calcium ion binding</i>	38	9,246	1,909	2,86E-03
MF	GO:0008201~ <i>heparin binding</i>	10	2,433	4,482	5,72E-03
MF	GO:0005488~ <i>binding</i>	293	71,290	1,079	8,34E-03
MF	GO:0016614~ <i>oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors</i>	10	2,433	3,980	1,36E-02
MF	GO:0005515~ <i>protein binding</i>	205	49,878	1,161	1,46E-02
MF	GO:0016616~ <i>oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor</i>	9	2,190	3,995	2,72E-02
MF	GO:0030247~ <i>polysaccharide binding</i>	11	2,676	3,298	2,78E-02
MF	GO:0001871~ <i>pattern binding</i>	11	2,676	3,298	2,78E-02
MF	GO:0019838~ <i>growth factor binding</i>	9	2,190	3,957	2,88E-02
MF	GO:0033764~ <i>steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor</i>	5	1,217	8,550	3,69E-02
MF	GO:0005201~ <i>extracellular matrix structural constituent</i>	8	1,946	4,295	3,74E-02
MF	GO:0050327~ <i>testosterone 17-beta-dehydrogenase activity</i>	3	0,730	34,626	3,95E-02
MF	GO:0005172~ <i>vascular endothelial growth factor receptor binding</i>	3	0,730	34,626	3,95E-02
MF	GO:0005539~ <i>glycosaminoglycan binding</i>	10	2,433	3,298	4,90E-02

¹Número de genes diana de 1,25(OH)₂D₃ incluidos en cada término; ²Porcentaje de genes incluidos en cada término calculado con respecto al número total de genes analizados; ³Veces de enriquecimiento; ⁴Benjamini & Hochberg False Discovery Rate; ⁵Proceso biológico; ⁶Componente celular; ⁷Función molecular.

Tabla 8. Resultados del análisis de enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por 1,25(OH)₂D₃ en NFs de colon humano.

Categoría	Término	Nº¹	%²	Enriq.³	FDR⁴
BP ⁵	GO:0048731~ <i>system development</i>	102	22,768	1,867	1,70E-09
BP	GO:0048856~ <i>anatomical structure development</i>	106	23,661	1,789	7,48E-09
BP	GO:0006695~ <i>cholesterol biosynthetic process</i>	10	2,232	16,403	7,15E-08
BP	GO:0016126~ <i>sterol biosynthetic process</i>	11	2,455	13,403	8,07E-08
BP	GO:0009611~ <i>response to wounding</i>	37	8,259	2,977	1,55E-07
BP	GO:0006694~ <i>steroid biosynthetic process</i>	15	3,348	7,526	1,63E-07
BP	GO:0048513~ <i>organ development</i>	76	16,964	1,865	1,24E-06
BP	GO:0008610~ <i>lipid biosynthetic process</i>	26	5,804	3,433	2,87E-06
BP	GO:0032502~ <i>developmental process</i>	115	25,670	1,558	3,18E-06
BP	GO:0008203~ <i>cholesterol metabolic process</i>	14	3,125	6,490	3,62E-06
BP	GO:0007275~ <i>multicellular organismal development</i>	106	23,661	1,578	7,17E-06
BP	GO:0016125~ <i>sterol metabolic process</i>	14	3,125	5,911	1,10E-05
BP	GO:0042127~ <i>regulation of cell proliferation</i>	42	9,375	2,276	2,06E-05
BP	GO:0009605~ <i>response to external stimulus</i>	45	10,045	2,100	6,63E-05
BP	GO:0009653~ <i>anatomical structure morphogenesis</i>	54	12,054	1,924	7,27E-05
BP	GO:0051239~ <i>regulation of multicellular organismal process</i>	45	10,045	2,048	1,26E-04
BP	GO:0042060~ <i>wound healing</i>	17	3,795	3,796	1,87E-04
BP	GO:0050793~ <i>regulation of developmental process</i>	35	7,813	2,215	3,53E-04
BP	GO:0008202~ <i>steroid metabolic process</i>	17	3,795	3,589	3,76E-04
BP	GO:0030154~ <i>cell differentiation</i>	65	14,509	1,693	3,79E-04
BP	GO:0006954~ <i>inflammatory response</i>	22	4,911	2,887	4,62E-04
BP	GO:0048869~ <i>cellular developmental process</i>	66	14,732	1,650	7,20E-04
BP	GO:0007155~ <i>cell adhesion</i>	35	7,813	2,132	7,60E-04
BP	GO:0022610~ <i>biological adhesion</i>	35	7,813	2,129	7,71E-04
BP	GO:0008299~ <i>isoprenoid biosynthetic process</i>	6	1,339	12,794	1,36E-03
BP	GO:0065008~ <i>regulation of biological quality</i>	58	12,946	1,684	1,43E-03
BP	GO:0008284~ <i>positive regulation of cell proliferation</i>	24	5,357	2,472	2,02E-03
BP	GO:0050878~ <i>regulation of body fluid levels</i>	13	2,902	3,932	2,03E-03
BP	GO:0050817~ <i>coagulation</i>	11	2,455	4,599	2,34E-03
BP	GO:0007596~ <i>blood coagulation</i>	11	2,455	4,599	2,34E-03
BP	GO:0042221~ <i>response to chemical stimulus</i>	51	11,384	1,698	3,62E-03
BP	GO:0007599~ <i>hemostasis</i>	11	2,455	4,344	3,76E-03
BP	GO:0007154~ <i>cell communication</i>	36	8,036	1,931	4,09E-03
BP	GO:0007399~ <i>nervous system development</i>	45	10,045	1,764	4,23E-03
BP	GO:0007267~ <i>cell-cell signaling</i>	29	6,473	2,061	6,99E-03
BP	GO:0007517~ <i>muscle organ development</i>	15	3,348	3,032	7,77E-03
BP	GO:0006720~ <i>isoprenoid metabolic process</i>	7	1,563	6,785	8,99E-03
BP	GO:0032501~ <i>multicellular organismal process</i>	129	28,795	1,285	9,58E-03
BP	GO:0030198~ <i>extracellular matrix organization</i>	10	2,232	4,101	1,26E-02
BP	GO:0042592~ <i>homeostatic process</i>	33	7,366	1,874	1,31E-02
BP	GO:0009887~ <i>organ morphogenesis</i>	27	6,027	2,042	1,34E-02
BP	GO:0031099~ <i>regeneration</i>	8	1,786	4,945	1,92E-02
BP	GO:0048519~ <i>negative regulation of biological process</i>	63	14,063	1,483	2,05E-02
BP	GO:0007229~ <i>integrin-mediated signaling pathway</i>	8	1,786	4,874	2,09E-02
BP	GO:0009719~ <i>response to endogenous stimulus</i>	21	4,688	2,211	2,39E-02
BP	GO:0030155~ <i>regulation of cell adhesion</i>	11	2,455	3,424	2,43E-02
BP	GO:0008219~ <i>cell death</i>	31	6,920	1,839	2,62E-02
BP	GO:0043062~ <i>extracellular structure organization</i>	12	2,679	3,140	2,70E-02
BP	GO:0016265~ <i>death</i>	31	6,920	1,826	2,93E-02
BP	GO:0006928~ <i>cell motion</i>	23	5,134	2,065	3,19E-02
BP	GO:0048771~ <i>tissue remodeling</i>	7	1,563	5,331	3,24E-02
BP	GO:0048878~ <i>chemical homeostasis</i>	24	5,357	1,999	3,67E-02
BP	GO:0001944~ <i>vasculature development</i>	15	3,348	2,549	4,06E-02
BP	GO:0006629~ <i>lipid metabolic process</i>	33	7,366	1,731	4,65E-02
BP	GO:0045595~ <i>regulation of cell differentiation</i>	23	5,134	1,994	4,75E-02
CC ⁶	GO:0044421~ <i>extracellular region part</i>	59	13,170	2,600	4,13E-10
CC	GO:0031012~ <i>extracellular matrix</i>	32	7,143	3,924	2,41E-09
CC	GO:0005578~ <i>proteinaceous extracellular matrix</i>	30	6,696	3,966	7,80E-09

CC	GO:0005576~ <i>extracellular region</i>	85	18,973	1,789	1,09E-06
CC	GO:0044420~ <i>extracellular matrix part</i>	15	3,348	5,424	8,88E-06
CC	GO:0005581~ <i>collagen</i>	9	2,009	10,879	1,62E-05
CC	GO:0005604~ <i>basement membrane</i>	10	2,232	5,424	1,20E-03
CC	GO:0005615~ <i>extracellular space</i>	33	7,366	2,038	2,52E-03
CC	GO:0044459~ <i>plasma membrane part</i>	78	17,411	1,498	2,78E-03
CC	GO:0031226~ <i>intrinsic to plasma membrane</i>	48	10,714	1,671	7,13E-03
CC	GO:0009897~ <i>external side of plasma membrane</i>	13	2,902	3,235	9,66E-03
CC	GO:0031233~ <i>intrinsic to external side of plasma membrane</i>	4	0,893	16,923	1,85E-02
CC	GO:0000267~ <i>cell fraction</i>	41	9,152	1,602	4,23E-02
<hr/>					
MF ⁷	GO:0005201~ <i>extracellular matrix structural constituent</i>	12	2,679	5,886	8,27E-05
MF	GO:0005102~ <i>receptor binding</i>	42	9,375	2,000	4,36E-04
MF	GO:0008092~ <i>cytoskeletal protein binding</i>	28	6,250	2,343	1,02E-03
MF	GO:0005515~ <i>protein binding</i>	228	50,893	1,179	1,99E-03
MF	GO:0004175~ <i>endopeptidase activity</i>	22	4,911	2,475	3,60E-03
MF	GO:0008009~ <i>chemokine activity</i>	7	1,563	6,419	1,05E-02
MF	GO:0003779~ <i>actin binding</i>	19	4,241	2,458	1,18E-02
MF	GO:0042379~ <i>chemokine receptor binding</i>	7	1,563	6,026	1,47E-02

¹Número de genes diana de 1,25(OH)₂D₃ incluidos en cada término; ²Porcentaje de genes incluidos en cada término calculado con respecto al número total de genes analizados; ³Veces de enriquecimiento; ⁴Benjamini & Hochberg False Discovery Rate; ⁵Proceso biológico; ⁶Componente celular; ⁷Función molecular.

Tabla 9. Resultados del análisis de enriquecimiento funcional de los genes inducidos por 1,25(OH)₂D₃ en CAFs de colon humano.

Categoría	Término	Nº ¹	% ²	Enriq. ³	FDR ⁴
BP ⁵	GO:0007507~heart development	22	4,603	3,862	4,63E-06
BP	GO:0065008~regulation of biological quality	72	15,063	1,850	5,42E-06
BP	GO:0035295~tube development	20	4,184	3,431	1,08E-04
BP	GO:0048731~system development	95	19,874	1,539	1,65E-04
BP	GO:0010941~regulation of cell death	43	8,996	1,991	4,43E-04
BP	GO:0048856~anatomical structure development	99	20,711	1,479	5,23E-04
BP	GO:0048513~organ development	74	15,481	1,607	5,94E-04
BP	GO:0007275~multicellular organismal development	109	22,803	1,436	5,97E-04
BP	GO:0048754~branching morphogenesis of a tube	10	2,092	5,807	8,69E-04
BP	GO:0002252~immune effector process	14	2,929	3,943	9,65E-04
BP	GO:0032502~developmental process	116	24,268	1,391	1,21E-03
BP	GO:0006950~response to stress	71	14,854	1,590	1,26E-03
BP	GO:0009888~tissue development	36	7,531	2,043	1,45E-03
BP	GO:0042981~regulation of apoptosis	41	8,577	1,925	1,55E-03
BP	GO:0070482~response to oxygen levels	14	2,929	3,748	1,63E-03
BP	GO:0043067~regulation of programmed cell death	41	8,577	1,906	1,87E-03
BP	GO:0035239~tube morphogenesis	13	2,720	3,863	2,39E-03
BP	GO:0001763~morphogenesis of a branching structure	10	2,092	5,100	2,44E-03
BP	GO:0001666~response to hypoxia	13	2,720	3,662	3,97E-03
BP	GO:0001944~vasculature development	18	3,766	2,707	6,60E-03
BP	GO:0055114~oxidation reduction	33	6,904	1,949	7,11E-03
BP	GO:0007155~cell adhesion	35	7,322	1,887	8,01E-03
BP	GO:0022610~biological adhesion	35	7,322	1,884	8,21E-03
BP	GO:0060537~muscle tissue development	12	2,510	3,623	8,34E-03
BP	GO:0009790~embryonic development	30	6,276	1,993	9,63E-03
BP	GO:0030334~regulation of cell migration	14	2,929	3,127	9,74E-03
BP	GO:0060541~respiratory system development	11	2,301	3,844	1,00E-02
BP	GO:0048519~negative regulation of biological process	71	14,854	1,479	1,07E-02
BP	GO:0006814~sodium ion transport	12	2,510	3,484	1,16E-02
BP	GO:0048523~negative regulation of cellular process	66	13,808	1,501	1,22E-02
BP	GO:0009653~anatomical structure morphogenesis	51	10,669	1,608	1,37E-02
BP	GO:0001568~blood vessel development	17	3,556	2,619	1,44E-02
BP	GO:0050793~regulation of developmental process	33	6,904	1,848	1,71E-02
BP	GO:0002377~immunoglobulin production	6	1,255	7,549	1,81E-02
BP	GO:0042221~response to chemical stimulus	53	11,088	1,562	2,04E-02
BP	GO:0002440~production of molecular mediator of immune response	6	1,255	7,305	2,11E-02
BP	GO:0014706~striated muscle tissue development	11	2,301	3,489	2,12E-02
BP	GO:0030324~lung development	10	2,092	3,812	2,12E-02
BP	GO:0043009~chordate embryonic development	20	4,184	2,281	2,29E-02
BP	GO:0009792~embryonic development ending in birth or egg hatching	20	4,184	2,260	2,54E-02
BP	GO:0060548~negative regulation of cell death	21	4,393	2,202	2,56E-02
BP	GO:0048514~blood vessel morphogenesis	15	3,138	2,683	2,56E-02
BP	GO:0007517~muscle organ development	15	3,138	2,683	2,56E-02
BP	GO:0030323~respiratory tube development	10	2,092	3,700	2,61E-02
BP	GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	21	4,393	2,196	2,67E-02
BP	GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	10	2,092	3,664	2,80E-02
BP	GO:0033273~response to vitamin	8	1,674	4,575	3,01E-02
BP	GO:0040012~regulation of locomotion	14	2,929	2,752	3,12E-02
BP	GO:0051270~regulation of cell motion	14	2,929	2,738	3,26E-02
BP	GO:0048568~embryonic organ development	13	2,720	2,853	3,59E-02
BP	GO:0009605~response to external stimulus	40	8,368	1,652	3,61E-02
BP	GO:0022603~regulation of anatomical structure morphogenesis	15	3,138	2,585	3,61E-02
BP	GO:0001501~skeletal system development	19	3,975	2,248	3,68E-02
BP	GO:0001655~urogenital system development	10	2,092	3,431	4,37E-02
BP	GO:0043066~negative regulation of apoptosis	20	4,184	2,132	4,88E-02
BP	GO:0010942~positive regulation of cell death	23	4,812	1,996	4,88E-02
BP	GO:0042592~homeostatic process	34	7,113	1,709	4,97E-02

CC ⁶	GO:0031012~ <i>extracellular matrix</i>	27	5,649	3,074	1,09E-05
CC	GO:0044421~ <i>extracellular region part</i>	50	10,460	2,046	3,16E-05
CC	GO:0005578~ <i>proteinaceous extracellular matrix</i>	25	5,230	3,069	3,17E-05
CC	GO:0005576~ <i>extracellular region</i>	83	17,364	1,622	1,00E-04
CC	GO:0044420~ <i>extracellular matrix part</i>	13	2,720	4,364	5,66E-04
CC	GO:0005604~ <i>basement membrane</i>	9	1,883	4,532	1,07E-02
CC	GO:0005615~ <i>extracellular space</i>	32	6,695	1,835	1,83E-02
MF ⁷	GO:0016614~ <i>oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors</i>	14	2,929	4,772	1,08E-04
MF	GO:0016616~ <i>oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor</i>	13	2,720	4,942	1,80E-04
MF	GO:0005488~ <i>binding</i>	346	72,385	1,092	2,49E-04
MF	GO:0016491~ <i>oxidoreductase activity</i>	35	7,322	2,008	2,26E-03
MF	GO:0031402~ <i>sodium ion binding</i>	12	2,510	4,055	2,71E-03
MF	GO:0046983~ <i>protein dimerization activity</i>	27	5,649	1,970	2,00E-02
MF	GO:0050661~ <i>NADP or NADPH binding</i>	6	1,255	6,590	2,92E-02
MF	GO:0015293~ <i>symporter activity</i>	11	2,301	3,175	3,67E-02
MF	GO:0005515~ <i>protein binding</i>	234	48,954	1,135	3,78E-02

¹Número de genes diana de 1,25(OH)₂D₃ incluidos en cada término; ²Porcentaje de genes incluidos en cada término calculado con respecto al número total de genes analizados; ³Veces de enriquecimiento; ⁴Benjamini & Hochberg False Discovery Rate; ⁵Proceso biológico; ⁶Componente celular; ⁷Función molecular.

Tabla 10. Resultados del análisis de enriquecimiento funcional de los genes reprimidos por 1,25(OH)₂D₃ en CAFs de colon humano.

Categoría	Término	Nº¹	%²	Enriq.³	FDR⁴
BP ⁵	GO:0007155~ <i>cell adhesion</i>	49	7,270	2,116	2,10E-05
	GO:0022610~ <i>biological adhesion</i>	49	7,270	2,113	2,23E-05
	GO:0048731~ <i>system development</i>	115	17,062	1,492	8,87E-05
	GO:0048856~ <i>anatomical structure development</i>	122	18,101	1,459	1,15E-04
	GO:0007160~ <i>cell-matrix adhesion</i>	14	2,077	4,755	1,17E-04
	GO:0031589~ <i>cell-substrate adhesion</i>	14	2,077	4,318	3,42E-04
	GO:0048513~ <i>organ development</i>	87	12,908	1,513	1,17E-03
	GO:0009653~ <i>anatomical structure morphogenesis</i>	65	9,644	1,641	1,33E-03
	GO:0007275~ <i>multicellular organismal development</i>	128	18,991	1,350	2,61E-03
	GO:0055065~ <i>metal ion homeostasis</i>	19	2,819	2,802	2,75E-03
	GO:0032502~ <i>developmental process</i>	137	20,326	1,315	4,48E-03
	GO:0006875~ <i>cellular metal ion homeostasis</i>	18	2,671	2,776	4,79E-03
	GO:0030154~ <i>cell differentiation</i>	79	11,721	1,459	8,67E-03
	GO:0006954~ <i>inflammatory response</i>	24	3,561	2,232	8,90E-03
	GO:0009887~ <i>organ morphogenesis</i>	35	5,193	1,876	9,14E-03
	GO:0006935~ <i>chemotaxis</i>	15	2,226	2,834	1,48E-02
	GO:0042330~ <i>taxis</i>	15	2,226	2,834	1,48E-02
	GO:0008544~ <i>epidermis development</i>	16	2,374	2,628	2,03E-02
	GO:0000165~ <i>MAPKKK cascade</i>	16	2,374	2,628	2,03E-02
	GO:0051246~ <i>regulation of protein metabolic process</i>	33	4,896	1,827	2,12E-02
	GO:0055080~ <i>cation homeostasis</i>	21	3,116	2,219	2,33E-02
	GO:0048869~ <i>cellular developmental process</i>	79	11,721	1,400	2,85E-02
	GO:0030003~ <i>cellular cation homeostasis</i>	19	2,819	2,261	3,39E-02
	GO:0032268~ <i>regulation of cellular protein metabolic process</i>	29	4,303	1,849	3,66E-02
	GO:0030198~ <i>extracellular matrix organization</i>	11	1,632	3,197	3,92E-02
	GO:0030199~ <i>collagen fibril organization</i>	6	0,890	6,254	4,07E-02
	GO:0050801~ <i>ion homeostasis</i>	26	3,858	1,922	4,07E-02
	GO:0007398~ <i>ectoderm development</i>	16	2,374	2,430	4,34E-02
	GO:0007243~ <i>protein kinase cascade</i>	24	3,561	1,961	4,81E-02
	GO:0009611~ <i>response to wounding</i>	31	4,599	1,768	4,94E-02
CC ⁶	GO:0044421~ <i>extracellular region part</i>	65	9,644	2,028	1,09E-06
	GO:0005578~ <i>proteinaceous extracellular matrix</i>	31	4,599	2,902	4,72E-06
	GO:0031012~ <i>extracellular matrix</i>	32	4,748	2,779	7,62E-06
	GO:0005625~ <i>soluble fraction</i>	25	3,709	2,393	1,84E-03
	GO:0005576~ <i>extracellular region</i>	95	14,095	1,416	5,02E-03
	GO:0005615~ <i>extracellular space</i>	41	6,083	1,793	5,67E-03
	GO:0044420~ <i>extracellular matrix part</i>	13	1,929	3,329	7,22E-03
	GO:0005887~ <i>integral to plasma membrane</i>	61	9,050	1,538	1,08E-02
	GO:0031226~ <i>intrinsic to plasma membrane</i>	62	9,199	1,529	1,13E-02
CC	GO:0005581~ <i>collagen</i>	7	1,039	5,992	1,29E-02
MF ⁷	GO:0005102~ <i>receptor binding</i>	61	9,050	2,085	1,19E-06
	GO:0001664~ <i>G-protein-coupled receptor binding</i>	17	2,522	4,638	1,04E-05
	GO:0008009~ <i>chemokine activity</i>	10	1,484	6,584	2,38E-04
	GO:0042379~ <i>chemokine receptor binding</i>	10	1,484	6,181	4,07E-04
	GO:0008092~ <i>cytoskeletal protein binding</i>	35	5,193	2,103	9,57E-04
	GO:0003779~ <i>actin binding</i>	25	3,709	2,323	3,18E-03
	GO:0042277~ <i>peptide binding</i>	18	2,671	2,685	6,11E-03
	GO:0005201~ <i>extracellular matrix structural constituent</i>	11	1,632	3,874	7,77E-03
	GO:0001871~ <i>pattern binding</i>	15	2,226	2,950	8,63E-03
	GO:0030247~ <i>polysaccharide binding</i>	15	2,226	2,950	8,63E-03
	GO:0008201~ <i>heparin binding</i>	11	1,632	3,234	3,12E-02
	GO:0005539~ <i>glycosaminoglycan binding</i>	13	1,929	2,812	3,41E-02
	GO:0030246~ <i>carbohydrate binding</i>	23	3,412	1,968	4,98E-02

¹Número de genes diana de 1,25(OH)₂D₃ incluidos en cada término; ²Porcentaje de genes incluidos en cada término calculado con respecto al número total de genes analizados; ³Veces de enriquecimiento; ⁴Benjamini & Hochberg False Discovery Rate; ⁵Proceso biológico; ⁶Componente celular; ⁷Función molecular.

2.5. La represión de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 es necesaria para el efecto inhibitorio de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos de colon humano

A continuación estudiamos la posible implicación de algunos de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en el análisis de expresión génica global en la inhibición de las propiedades protumorales de los fibroblastos colónicos ejercida por la 1,25(OH)₂D₃. Debido a las dificultades asociadas al manejo de los cultivos primarios de fibroblastos (disponibilidad de un número muy reducido de células, entrada en senescencia con los pases, etc), nos planteamos usar como modelo para estos experimentos la línea celular establecida de fibroblastos de colon humano CCD18Co. Analizamos en primer lugar su expresión de VDR. Los fibroblastos CCD18Co expresan niveles basales de RNA y de proteína de VDR, que aumentan tras el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ (**Figura 20A y 20B**). A continuación, estudiamos el efecto de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la proliferación de estos fibroblastos y sobre su capacidad de contraer geles de colágeno. Al igual que en la mayoría de los fibroblastos analizados previamente, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe de forma significativa esas dos propiedades celulares en los fibroblastos CCD18Co (**Figura 20C y 20D**). Estos resultados indican que dichos fibroblastos expresan VDR y responden a 1,25(OH)₂D₃, pudiendo ser, por tanto, utilizados como modelo para el estudio propuesto.

De los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en el estudio de *microarrays* seleccionamos las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13, que se reprimen por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs (**Figura 19**), para analizar su implicación en la inhibición de las propiedades protumorales de los fibroblastos colónicos por 1,25(OH)₂D₃. En primer lugar, confirmamos que, al igual que en los fibroblastos primarios, la expresión de dichas quimioquinas se reprime por 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos CCD18Co (**Figura 21A**). En segundo lugar, realizamos ensayos de contracción de geles de colágeno con dichos fibroblastos en presencia de 1,25(OH)₂D₃ y/o de las quimioquinas seleccionadas añadidas exógenamente (recombinantes). Las tres quimioquinas reducen de forma estadísticamente significativa la inhibición ejercida por la 1,25(OH)₂D₃ sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos CCD18Co, siendo la reducción de aproximadamente un 42% (CCL2), 24% (CCL11) y 20% (CCL13) (**Figura 21B**). Este resultado sugiere que la acción de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la habilidad de los fibroblastos colónicos para contraer la ECM está mediada, al menos en parte, por la inhibición de la expresión de estas quimioquinas.

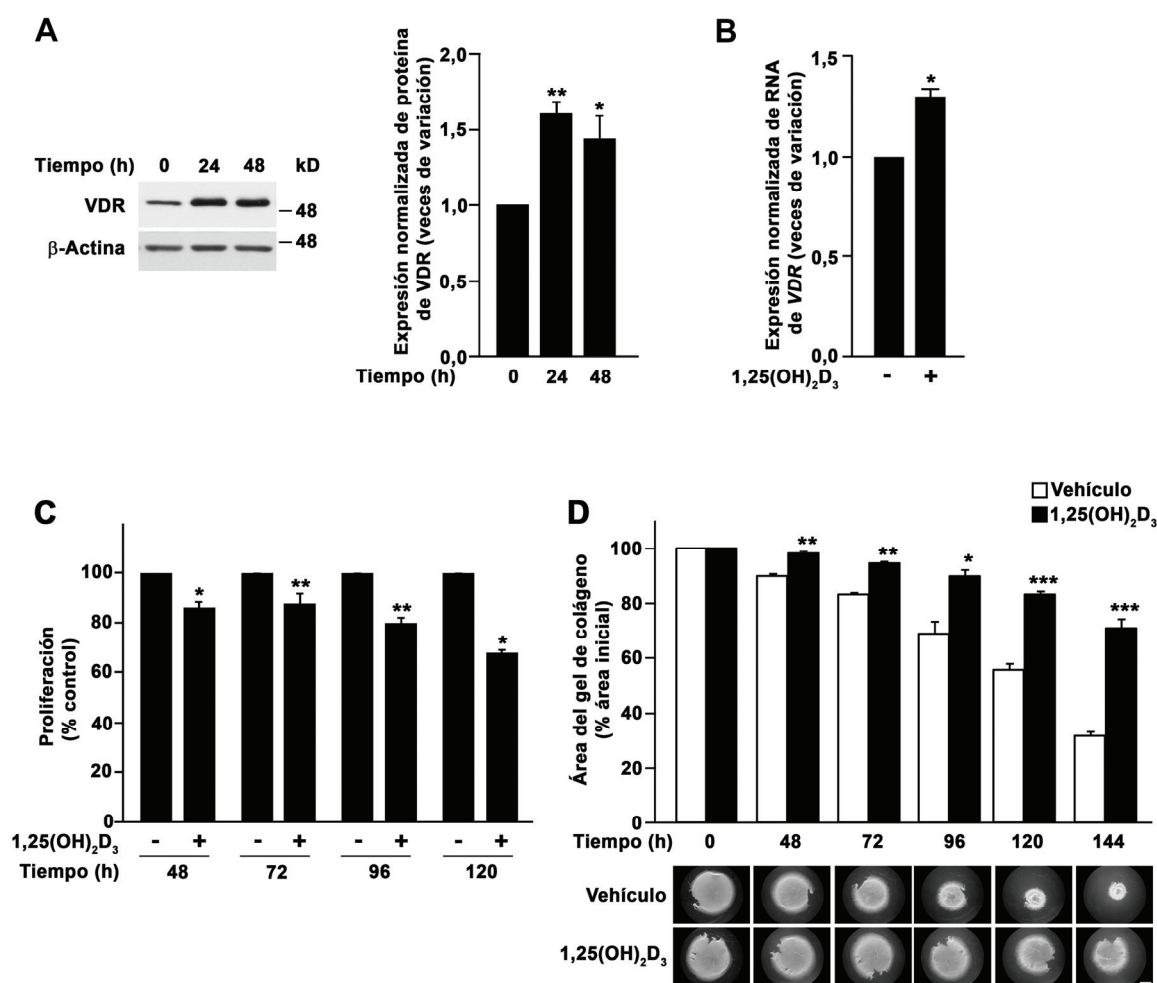


Figura 20. Los fibroblastos de colon humano CCD18Co expresan VDR y la 1,25(OH)₂D₃ inhibe sus acciones protumorales.

(A) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de proteína de VDR en fibroblastos CCD18Co tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante los tiempos indicados. Como control de carga se utilizó β -actina. Se muestran imágenes de un experimento representativo (izquierda) y la media \pm SEM de la cuantificación de tres experimentos independientes (derecha). (B) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de RNA de VDR en fibroblastos CCD18Co tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 96 h. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *SDHA* según se indica en Materiales y Métodos. Se muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (C) Cuantificación de la capacidad proliferativa de fibroblastos CCD18Co tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante los tiempos indicados. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la proliferación de las células tratadas con vehículo a cada tiempo (% control). Se representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (D) Ensayo de contracción de geles de colágeno por fibroblastos CCD18Co en presencia de 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo. Se incluyen imágenes de un experimento representativo mostrando la apariencia de los geles de colágeno a cada tiempo (abajo) y la cuantificación (media \pm SEM) de tres experimentos independientes (arriba). Barra de escala, 400 μ m.

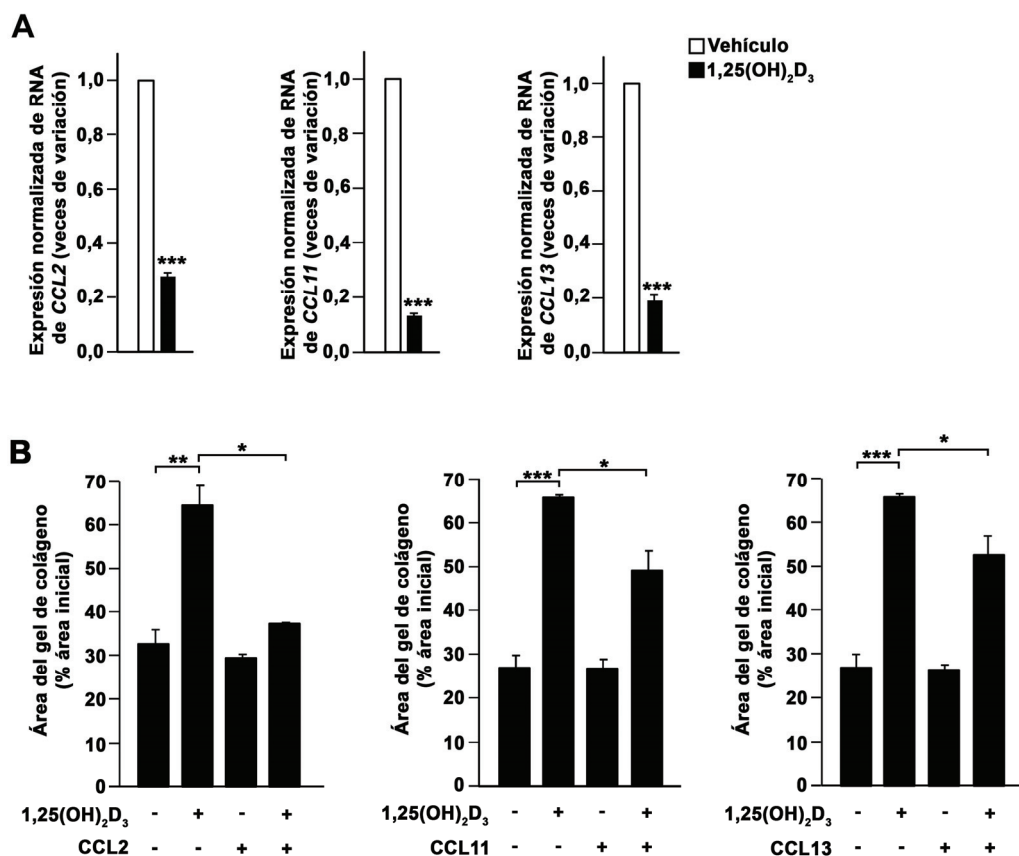


Figura 21. Las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 se reprimen por 1,25(OH)₂D₃ e inhiben los efectos de ésta sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos de colon humano CCD18Co. (A) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de RNA de *CCL2*, *CCL11* y *CCL13* en fibroblastos CCD18Co tratados con 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo durante 48 h. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *SDHA* según se indica en Materiales y Métodos. Se muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (B) Ensayo de contracción de geles de colágeno por fibroblastos CCD18Co en presencia de 100 nM 1,25(OH)₂D₃ o vehículo y 100 ng/ml CCL2, CCL11, CCL13 o vehículo. Se muestra la cuantificación del área de los geles de colágeno a las 144 h de tratamiento y los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

3. Expresión de VDR y de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *CD82* y *S100A4* en muestras de pacientes con cáncer colorrectal

3.1. Análisis de la especificidad del anticuerpo anti-VDR

Antes de estudiar por inmunohistoquímica la expresión de VDR en muestras de pacientes con CRC, valoramos la especificidad del anticuerpo anti-VDR que queríamos utilizar. Primero llevamos a cabo *Western Blots* de células HEK293T transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de VDR o el vector vacío, y de células SW480-ADH en las que la expresión de VDR se ha interferido mediante la expresión de un shRNA dirigido contra *VDR* (shVDR) o que expresan un shRNA inespecífico (shControl) [162]. La incubación de las membranas con el anticuerpo anti-VDR muestra que la banda correspondiente a VDR (49 kD) se comporta según lo esperado en las células que sobreexpresan VDR y en las que se ha interferido su expresión (**Figura 22A**). Además, dicha banda no se detecta si las membranas se han incubado con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR (**Figura 22A**), o sin anticuerpo primario (datos no mostrados). Similares resultados se observaron al analizar lisados de tumores de pacientes con CRC (**Figura 22B**). También estudiamos la especificidad del anticuerpo anti-VDR en ensayos de inmunofluorescencia con las células HEK293T previamente descritas, obteniendo resultados equivalentes (**Figura 22C**). A continuación ampliamos el estudio a muestras de tejido analizadas por inmunohistoquímica. Primero estudiamos la expresión de Vdr en el intestino delgado (uno de los tejidos con mayor expresión de VDR) de ratones normales (*wild-type*, *Vdr*^{+/+}) y de ratones deficientes en *Vdr* (*Vdr*^{-/-}) como control negativo [122, 129]. La incubación de las secciones tisulares con el anticuerpo anti-VDR muestra una intensa señal predominantemente nuclear (aunque también citoplasmática) en las vellosidades y criptas intestinales (**Figura 23A**). Confirmando la especificidad del anticuerpo, dicha señal desaparece completamente en los tejidos procedentes de los ratones *Vdr*^{-/-} (**Figura 23A**), y en los tejidos que han sido incubados con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR (**Figura 23A**) o sin anticuerpo primario (datos no mostrados). Por último, un estudio inmunohistoquímico equivalente con muestras de pacientes con CRC arrojó resultados similares (**Figura 23B**). Todos estos datos indican que el anticuerpo seleccionado es específico y adecuado para analizar la expresión de VDR en tejidos humanos.

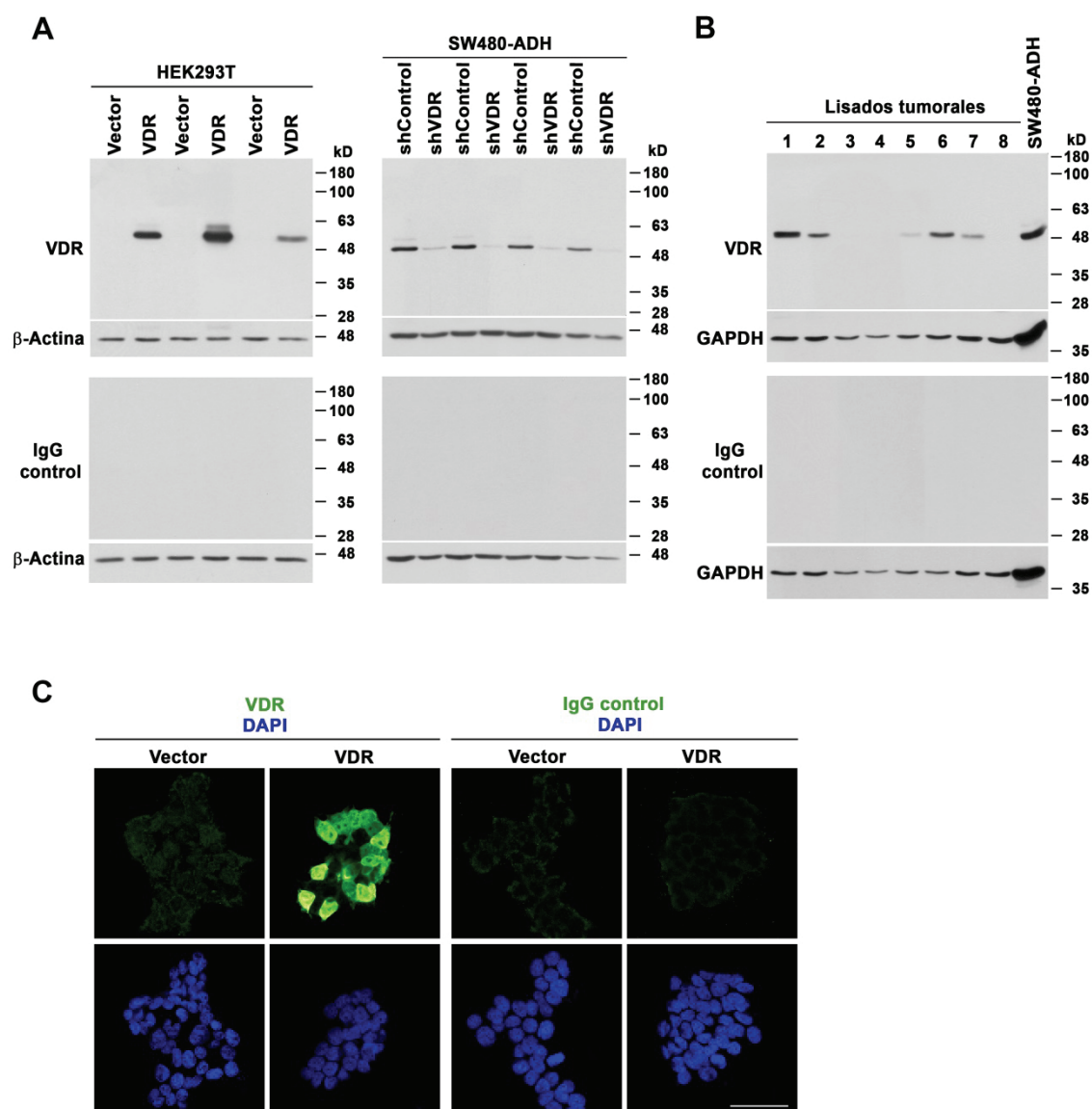


Figura 22. Análisis de la especificidad del anticuerpo anti-VDR por Western Blot e inmunofluorescencia. (A) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de proteína de VDR en células HEK293T transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de VDR o el vector vacío ($n = 3$) y en células SW480-ADH que expresan establemente un shRNA contra VDR (shVDR) o un shRNA inespecífico (shControl) ($n = 4$). Membranas equivalentes se incubaron con el anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR, o sin anticuerpo primario (datos no mostrados) para evaluar la especificidad de la señal. β -actina se utilizó como control de carga. (B) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de proteína de VDR en lisados de tumores colorrectales humanos ($n = 8$). Se incluyó un lisado de células SW480-ADH como control positivo. Membranas equivalentes se incubaron con el anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR, o sin anticuerpo primario (datos no mostrados) para evaluar la especificidad de la señal. GAPDH se utilizó como control de carga. (C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia y microscopía confocal que muestran la expresión de proteína de VDR en células HEK293T transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de VDR o el vector vacío. Cristales equivalentes se incubaron con el anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR, o sin anticuerpo primario (datos no mostrados) para evaluar la especificidad de la señal. Los núcleos están teñidos con DAPI. Barra de escala, 50 μ m.

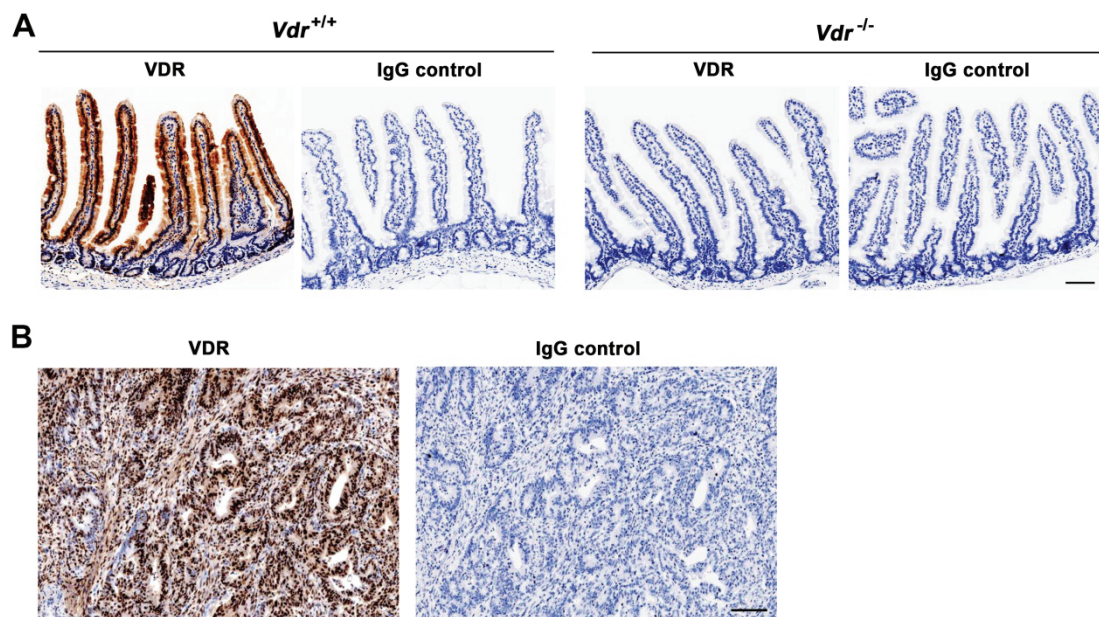


Figura 23. Análisis de la especificidad del anticuerpo anti-VDR por inmunohistoquímica. (A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de la expresión de proteína de Vdr en el intestino delgado de ratones *Vdr*^{+/+} y *Vdr*^{-/-}. Secciones tisulares equivalentes se incubaron con el anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR, o sin anticuerpo primario (datos no mostrados) para evaluar la especificidad de la señal. Barra de escala, 50 μm. (B) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de la expresión de proteína de VDR en tumores colorrectales humanos. Secciones tisulares equivalentes se incubaron con el anticuerpo anti-VDR, con una IgG control del mismo isotipo que el anticuerpo anti-VDR, o sin anticuerpo primario (datos no mostrados) para evaluar la especificidad de la señal. Barra de escala, 50 μm.

3.2. VDR se expresa en las células de carcinoma y en el estroma de tumores colorrectales humanos

Una vez confirmada la especificidad del anticuerpo anti-VDR, analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de VDR en tumores primarios de 658 pacientes con CRC metastásico de los que disponíamos de información clínica, incluyendo un seguimiento clínico prolongado. La **Tabla 11** contiene las características clinicopatológicas de los pacientes.

Los resultados muestran una intensa expresión nuclear y una expresión citoplasmática más débil de VDR tanto en las células de carcinoma como en las células del estroma de los tumores colorrectales (**Figura 24**). Sin embargo, la expresión de VDR en cada compartimento tumoral varía ampliamente entre pacientes: el 14,3% de los tumores analizados muestran elevados niveles de VDR en ambos compartimentos, el 11,2% presentan alta expresión de VDR en las células de carcinoma y baja expresión en las células del estroma, el 13,1% tienen altos niveles de VDR en el estroma y bajos en las células de carcinoma, y el 61,4% muestran baja expresión de VDR en ambos compartimentos (**Figura 24**).

Tabla 11. Características clinicopatológicas de los pacientes con CRC metastásico cuyos tumores primarios se utilizaron para los análisis de inmunohistoquímica.

Características	
Edad, mediana (rango)	68 (24-88)
Género, n (%)	
Mujer	259 (39,4)
Hombre	399 (60,6)
Grado ECOG¹, n (%)	
0	215 (32,7)
1	285 (43,3)
2	112 (17,0)
3	46 (7,0)
Número de sitios metastásicos, n (%)	
1-2	611 (92,9)
> 2	47 (7,1)
Solo metástasis hepáticas, n (%)	
No	462 (70,2)
Sí	196 (29,8)
Quimioterapia neoadyuvante, n (%)	
No	491 (74,6)
Sí	167 (25,4)
Tratamiento de 1ª línea metastásico, n (%)	
5-Fluorouracilo	380 (57,8)
Oxaliplatino	114 (17,3)
Irinotecán	164 (24,9)

¹Para detalles, véase Materiales y Métodos.

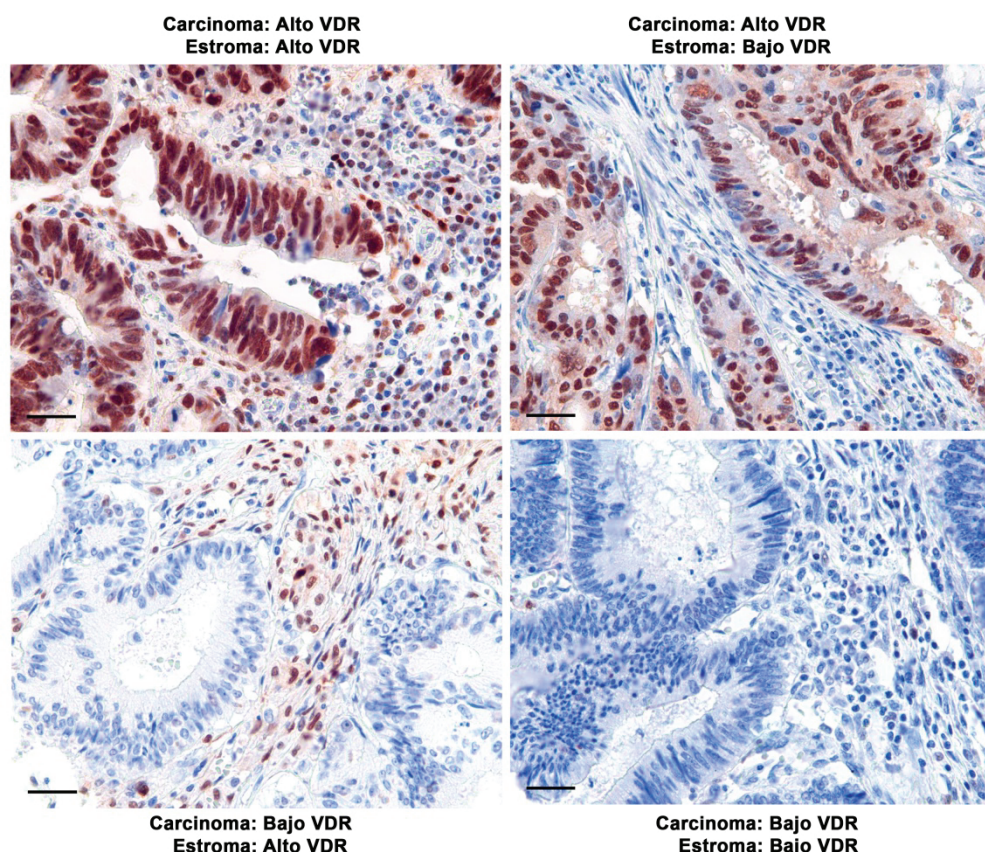


Figura 24. VDR se expresa en los compartimentos de carcinoma y de estroma de tumores colorrectales humanos. Imágenes representativas de los cuatro tipos de situaciones encontradas al analizar mediante inmunohistoquímica la expresión de proteína de VDR en tumores procedentes de 658 pacientes con CRC metastásico. Barras de escala, 20 μ m.

3.3. Altos niveles de expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral se asocian con un mejor pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal

A continuación, analizamos si los niveles de expresión de VDR en los distintos tipos celulares presentes en los tumores colorrectales tienen relación con el pronóstico de los pacientes con CRC. En primer lugar, una expresión elevada de VDR en las células de carcinoma se asocia de manera significativa con una mayor OS de los pacientes (mediana: 17,4 meses vs 12,6 meses) (**Figura 25A**). Sin embargo, la asociación entre alta expresión de VDR y PFS (mediana: 10,1 meses vs 7,5 meses) no llega a ser estadísticamente significativa (**Figura 25A**). En segundo lugar, los pacientes con niveles elevados de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral presentan una OS (mediana: 17,2 vs 10,6 meses) y una PFS (mediana: 11,5 meses vs 6,9 meses) significativamente más largas que los pacientes con niveles de VDR bajos en estas células (**Figura 25A**). En tercer lugar, no observamos relación entre la expresión de VDR en los linfocitos del estroma tumoral y la OS o la PFS de los pacientes (**Figura 25A**). El análisis combinado de la expresión de VDR en las células de carcinoma y en los fibroblastos del estroma tumoral muestra que los pacientes con alta expresión de VDR en ambos tipos celulares tienen una OS más larga, pero no se observaron diferencias significativas a nivel de PFS (**Figura 25B**).

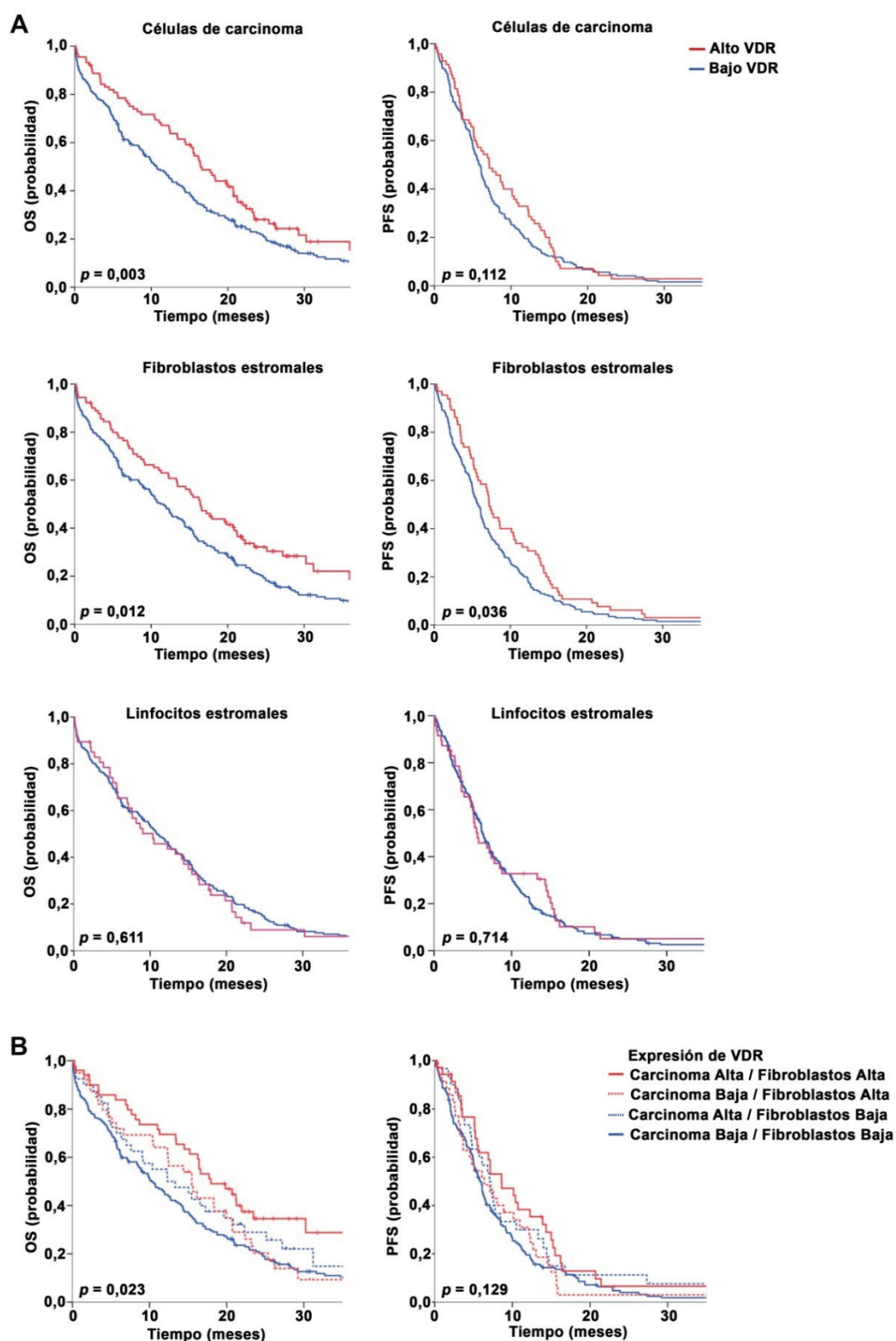


Figura 25. Asociación entre los niveles de expresión de proteína de VDR en los distintos tipos celulares de los tumores colorrectales y el pronóstico de los pacientes. (A) Gráficas de Kaplan-Meier mostrando la OS o la PFS de pacientes con CRC metastásico ($n = 658$) estratificados por los niveles de expresión de proteína de VDR en las células de carcinoma, los fibroblastos del estroma tumoral, o los linfocitos del estroma tumoral. (B) Gráficas de Kaplan-Meier mostrando la OS o la PFS de pacientes con CRC metastásico ($n = 658$) estratificados por los niveles de expresión de proteína de VDR en las células de carcinoma y en los fibroblastos del estroma tumoral.

Además, el análisis multivariante de regresión de Cox muestra que la expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral es un factor pronóstico independiente para la OS (Tabla 12), existiendo una fuerte tendencia cercana a la significancia estadística en el caso de la PFS (Tabla 13). Otros factores pronóstico independientes son el grado ECOG para la OS y la administración de quimioterapia neoadyuvante para la OS y la PFS (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Análisis univariante y multivariante de regresión de Cox del valor pronóstico de los niveles de expresión de proteína de VDR y de otras variables clinicopatológicas en la OS de pacientes con CRC metastásico.

Variable	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	HR ¹ (95% CI ²)	p	HR (95% CI)	p
Género				
Mujer	1,00	0,271		
Hombre	1,11 (0,71 a 1,12)			
Grado ECOG³				
0	1,00	0,001	1,00	0,019
1	1,57 (1,15 a 2,12)		1,49 (0,89 a 2,07)	
2	2,82 (1,77 a 4,44)		1,90 (0,93 a 2,48)	
3	2,83 (1,98 a 4,04)		2,51 (1,61 a 5,61)	
Número de sitios metastásicos				
1-2	1,00	0,087		
> 2	1,34 (0,95 a 1,86)			
Quimioterapia neoadyuvante				
No	1,00	0,003	1,00	0,002
Sí	0,54 (0,42 a 0,69)		0,42 (0,38 a 0,62)	
Tratamiento de 1ª línea metastásico				
5-Fluorouracilo	1,00	0,004	1,00	0,076
Oxaliplatino	0,73 (0,54 a 0,96)		0,77 (0,58 a 1,93)	
Irinotecán	0,68 (0,52 a 0,87)		0,70 (0,47 a 1,01)	
Expresión de proteína de VDR en los fibroblastos estromales				
Baja	1,00	0,012	1,00	0,043
Alta	0,70 (0,52 a 0,92)		0,71 (0,46 a 1,14)	
Expresión de proteína de VDR en las células de carcinoma				
Baja	1,00	0,003	1,00	0,165
Alta	0,69 (0,52 a 0,93)		0,81 (0,65 a 1,25)	

¹Hazard ratio; ²Intervalo de confianza; ³Para detalles, véase Materiales y Métodos.

Tabla 13. Análisis univariante y multivariante de regresión de Cox del valor pronóstico de los niveles de expresión de proteína de VDR y de otras variables clinicopatológicas en la PFS de pacientes con CRC metastásico.

Variable	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	HR ¹ (95% CI ²)	p	HR (95% CI)	p
Género				
Mujer	1,00	0,527		
Hombre	0,95 (0,81 a 1,11)			
Grado ECOG³				
0	1,00	0,011	1,00	0,101
1	1,36 (1,12 a 1,62)		1,32 (0,95 a 1,86)	
2	1,36 (1,05 a 1,73)		1,20 (0,79 a 1,82)	
3	1,77 (1,08 a 1,97)		1,76 (0,96 a 1,95)	
Número de sitios metastásicos				
1-2	1,00	0,362		
> 2	1,13 (0,87 a 1,45)			
Quimioterapia neoadyuvante				
No	1,00	0,001	1,00	0,002
Sí	0,63 (0,52 a 0,75)		0,55 (0,39 a 0,75)	
Tratamiento de 1ª línea metastásico				
5-Fluorouracilo	1,00	0,012	1,00	0,057
Oxaliplatino	0,61 (0,41 a 1,03)		0,83 (0,58 a 1,19)	
Irinotecán	0,61 (0,45 a 1,12)		0,88 (0,61 a 1,27)	
Expresión de proteína de VDR en los fibroblastos estromales				
Baja	1,00	0,036	1,00	0,067
Alta	0,75 (0,56 a 1,01)		0,83 (0,61 a 1,14)	
Expresión de proteína de VDR en las células de carcinoma				
Baja	1,00	0,112	1,00	0,815
Alta	0,95 (0,64 a 1,12)		0,94 (0,75 a 1,43)	

¹Hazard ratio; ²Intervalo de confianza; ³Para detalles, véase Materiales y Métodos.

Un 5-10% de los tumores colorrectales tienen mutaciones en el oncogén *BRAF* y alrededor de un 20% presentan fenotipo de MSI, siendo ambos importantes factores pronóstico negativo y positivo, respectivamente, en CRC [180, 261]. Por ello, analizamos la presencia de estas alteraciones en los tumores colorrectales de nuestra serie de 658 pacientes y estudiamos el efecto que la expresión de VDR en los fibroblastos estromales tiene en la supervivencia de los distintos subgrupos de pacientes establecidos en función de ellas. La asociación estadísticamente significativa entre alta expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral y una OS más larga se mantiene en los subgrupos de pacientes que presentan o no fenotipo de MSI y en los que no tienen *BRAF* mutado, mientras que en el subgrupo de pacientes con *BRAF* mutado se observa una tendencia que no alcanza la significancia estadística probablemente por el reducido número de pacientes en este subgrupo (**Figura 26**).

No encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de VDR en las células de carcinoma o en los fibroblastos del estroma tumoral y otras variables clinicopatológicas de los pacientes (**Tabla 14**).

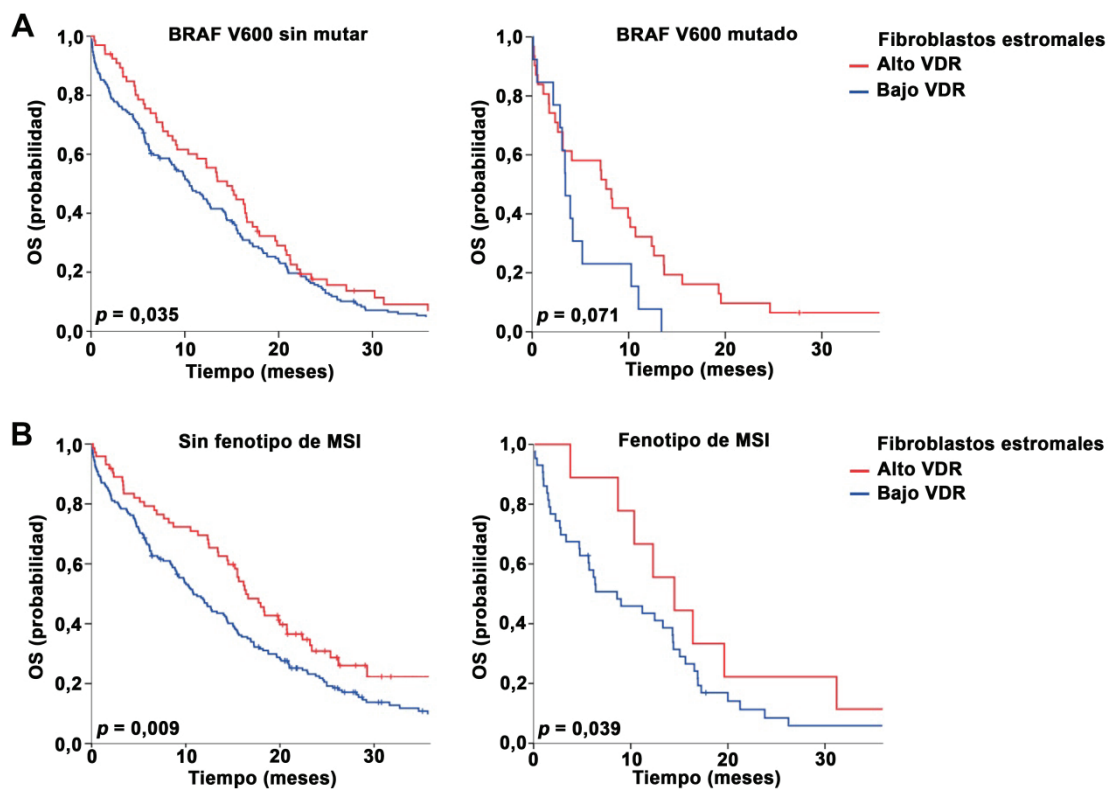


Figura 26. Asociación entre la expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral y la supervivencia de distintos subgrupos de pacientes con CRC metastásico. (A) Gráficas de Kaplan-Meier mostrando la OS de pacientes con CRC con ($n = 51$) o sin ($n = 607$) mutaciones en la V600 de BRAF estratificados por los niveles de expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral. (B) Gráficas de Kaplan-Meier mostrando la OS de pacientes con CRC con ($n = 42$) o sin ($n = 616$) fenotipo de MSI estratificados por los niveles de expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral.

Tabla 14. Asociaciones estadísticas entre los niveles de expresión de proteína de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral o en las células de carcinoma y otras variables clinicopatológicas de los pacientes con CRC metastásico.

Variable	Expresión de proteína de VDR en los fibroblastos estromales (n = 658)			Expresión de proteína de VDR en las células de carcinoma (n = 658)		
	Baja (n = 478)	Alta (n = 180)	p	Baja (n = 490)	Alta (n = 168)	p
Género, n (%)						
Mujer	191 (40,0)	68 (37,8)	0,803	193 (39,4)	66 (39,3)	0,979
Hombre	287 (60,0)	112 (62,2)		297 (60,6)	102 (60,7)	
Grado ECOG¹, n (%)						
0	157 (32,8)	58 (32,2)	0,770	164 (33,5)	48 (28,6)	0,465
1	208 (43,6)	77 (42,8)		216 (44,1)	72 (42,9)	
2	76 (15,9)	36 (20,0)		74 (15,1)	38 (22,6)	
3	37 (7,7)	9 (5,0)		36 (7,3)	10 (5,9)	
Número de sitios metastásicos, n (%)						
1-2	447 (93,5)	164 (91,1)	0,431	450 (91,8)	161 (95,8)	0,196
> 2	31 (6,5)	16 (8,9)		40 (8,2)	7 (4,2)	
Solo metástasis hepáticas, n (%)						
No	321 (67,2)	141 (78,3)	0,810	335 (68,4)	127 (75,6)	0,810
Sí	157 (32,8)	39 (21,7)		155 (31,6)	41 (24,4)	
Quimioterapia neoadyuvante, n (%)						
No	369 (77,2)	122 (67,8)	0,120	385 (78,6)	106 (63,1)	0,091
Sí	109 (22,8)	58 (32,2)		105 (21,4)	62 (36,9)	
Tratamiento de 1ª línea metastásico, n (%)						
5-Fluorouracilo	283 (59,2)	97 (53,9)	0,269	283 (57,8)	97 (57,7)	0,893
Oxaliplatino	88 (18,4)	26 (14,4)		87 (17,8)	27 (16,1)	
Irinotecán	107 (22,4)	57 (31,7)		120 (24,4)	44 (26,2)	

¹Para detalles, véase Materiales y Métodos.

3.4. La expresión de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ *CD82* y *S100A4* en los fibroblastos del estroma tumoral se asocia con la expresión de VDR en dichas células y con la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal

A continuación quisimos analizar en nuestra serie de 658 pacientes con CRC metastásico la expresión mediante inmunohistoquímica de alguno de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en los análisis de expresión génica global y validados posteriormente a nivel de RT-qPCR. Para ello, seleccionamos *CD82* (también conocido como *KAI1*) que se induce por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs (**Figura 19**) y se ha descrito que actúa como supresor de metástasis [224, 240], y *S100A4* que se reprime por 1,25(OH)₂D₃ en NFs y en CAFs (**Figura 19**) y es un marcador de fibroblastos activados [9, 190]. El estudio realizado muestra que ambas proteínas se expresan de forma exclusiva en el estroma de los tumores colorrectales: *CD82* se localiza de modo difuso en el citoplasma y en la membrana de las células del estroma, y *S100A4* se expresa en el núcleo y en el citoplasma de los fibroblastos estromales. En ningún caso se detectó expresión de dichas proteínas en las células de carcinoma (**Figura 27A**).

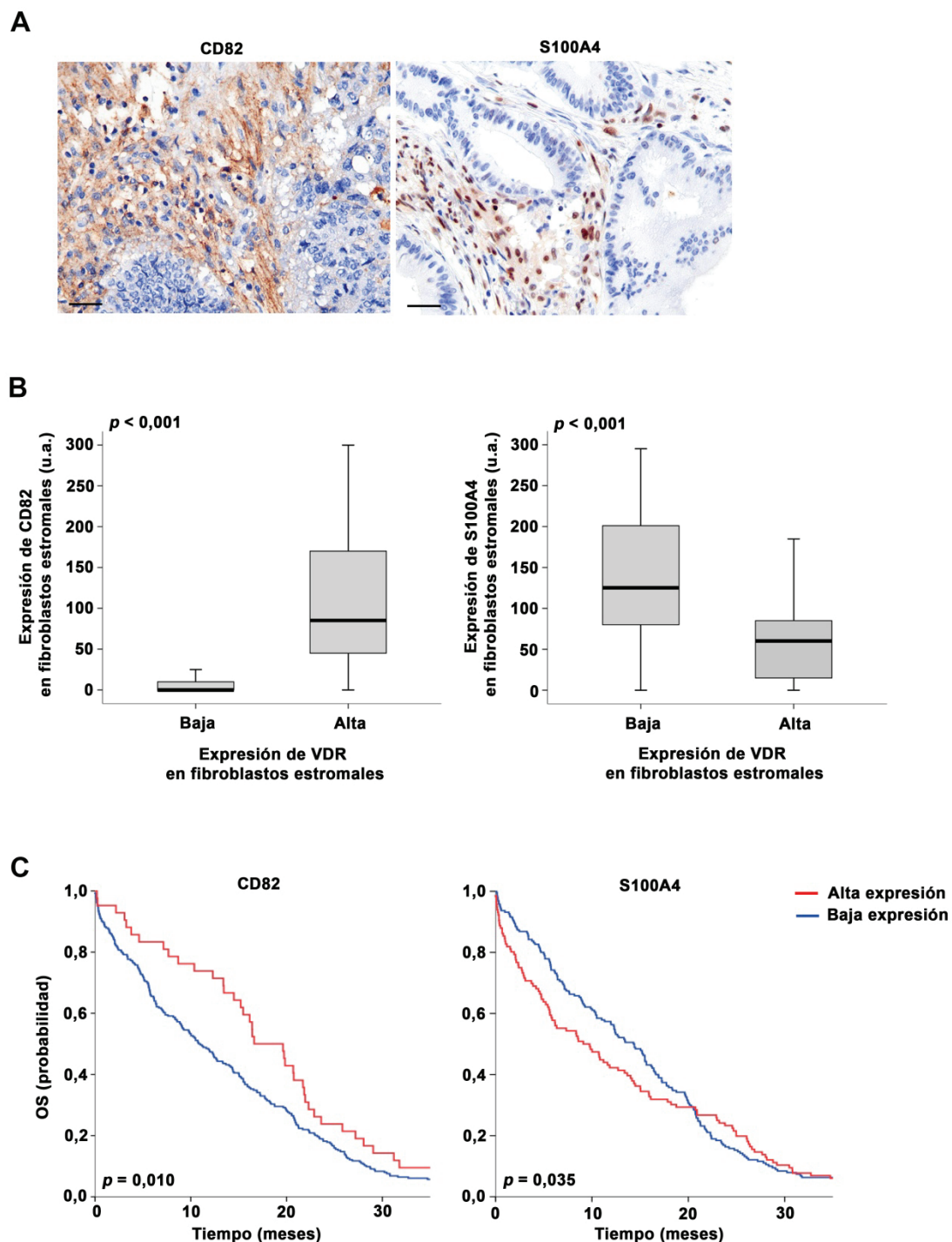


Figura 27. La expresión de CD82 o de S100A4 en los fibroblastos del estroma tumoral se asocia con la expresión de VDR en dichas células y con la supervivencia de los pacientes con CRC metastásico. (A) Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico de la expresión de proteína de CD82 y de S100A4 en 658 tumores colorrectales. Barras de escala, 20 μ m. (B) Los diagramas de cajas muestran la expresión de proteína de CD82 o de S100A4 en los fibroblastos del estroma tumoral categorizados según sus niveles de expresión de proteína de VDR (n = 658). Las cajas contienen los valores comprendidos entre los percentiles 25 y 75, la línea en el interior de cada caja corresponde a la mediana, y los extremos de las líneas exteriores indican los valores máximos y mínimos. (C) Gráficas de Kaplan-Meier mostrando la OS de pacientes con CRC metastásico (n = 658) estratificados por los niveles de expresión de proteína de CD82 o de S100A4 en los fibroblastos estromales del tumor.

De acuerdo con su identificación como genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los cultivos primarios de fibroblastos, los tumores colorrectales que presentan niveles elevados de VDR en los fibroblastos estromales tienen una expresión significativamente mayor de CD82 y menor de S100A4 en dichas células (**Figura 27B**). Finalmente, encontramos que altos niveles de expresión de CD82 o bajos niveles de expresión de S100A4 en los fibroblastos del estroma tumoral se asocian de manera significativa con una OS más larga de los pacientes con CRC metastásico (mediana: 21,4 meses vs 11,2 meses, para CD82; mediana: 14,9 meses vs 9,8 meses, para S100A4) (**Figura 27C**). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas a nivel de PFS (datos no mostrados).

Numerosos estudios epidemiológicos muestran una asociación inversa entre el estado vitamínico D (niveles circulantes de 25(OH)D₃) y la incidencia y/o mortalidad del CRC [66, 78, 104, 144, 177]. De acuerdo con ello, la 1,25(OH)₂D₃ y algunos de sus análogos ejercen acciones antitumorales en células en cultivo y en modelos animales de CRC [177]. Así, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la proliferación, la migración, la invasividad y el potencial angiogénico de las células de CRC, y aumenta su diferenciación y su sensibilidad a la apoptosis inducida por agentes quimioterápicos [66, 177]. Estas acciones están mediadas y dependen de la expresión de VDR en las células de carcinoma.

En los últimos años se ha demostrado que el microambiente tumoral contribuye a la tumorigénesis en diversos tipos de carcinomas [9, 20, 83, 178, 213]. De hecho, varios trabajos muestran que los subtipos de CRC con peor pronóstico se caracterizan por una reacción desmoplásica pronunciada, presencia de un alto número de fibroblastos estromales, y un patrón de expresión génica que incluye marcadores de fibroblastos activados y genes expresados específicamente por los fibroblastos del estroma tumoral [15, 23, 37, 95, 102, 107, 216, 241]. Todo ello sugiere que la combinación de agentes antiestromales con terapias antitumorales clásicas dirigidas contra las células de carcinoma podría tener beneficios terapéuticos en el tratamiento del CRC.

A pesar de los numerosos datos que apoyan la importante función del microambiente tumoral en el CRC y la acción protectora de la vitamina D frente a esta neoplasia, no existen estudios publicados sobre la posible acción de la 1,25(OH)₂D₃ en el estroma de los tumores colorrectales. Los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen, por tanto, la primera demostración de los efectos de la 1,25(OH)₂D₃ sobre el estroma tumoral en CRC.

1. Expresión de VDR en el estroma de los tumores colorrectales

Como se comenta en la Introducción, numerosos trabajos han analizado la expresión de VDR en CRC. La conclusión global más aceptada de los resultados obtenidos es que la expresión de VDR aumenta en las lesiones precancerosas y en los estadios tempranos de esta tumorigénesis (ACFs, pólipos y adenomas), mientras que disminuye en los estadios avanzados y en las metástasis en ganglios linfáticos [7, 39, 40, 60, 120, 142, 151, 172, 175, 209]. Sin embargo, estos estudios no especifican el compartimento o tipo celular del tumor que expresa VDR. Además, en muchos casos analizan de forma global la expresión de VDR en un fragmento de tejido tumoral (por RT-qPCR o *Western Blot*), por lo que los resultados obtenidos probablemente reflejan en gran medida la expresión de VDR en las células de carcinoma, ya que éstas suelen ser mayoritarias en el tumor con respecto a las células del estroma.

En esta Tesis hemos estudiado la expresión de VDR por RT-qPCR en cultivos primarios de NFs y CAFs derivados de biopsias de pacientes con CRC en distintos estadios (n = 32), así como por

inmunohistoquímica en tejido tumoral de pacientes de CRC metastásico (n = 658). El análisis de la expresión de RNA de *VDR* en los NFs y en los CAFs muestra que todos los fibroblastos primarios analizados expresan *VDR* (Figura 15A). De acuerdo con esto, todos ellos responden al tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con un aumento en los niveles de expresión de RNA de *CYP24A1* (Figura 15C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *VDR* entre NFs y CAFs, aunque sí existe cierta variabilidad entre pacientes, más pronunciada en los CAFs (Figura 15A). Estas diferencias en la expresión de *VDR* parecen tener consecuencias funcionales, ya que existe una correlación directa entre la expresión de RNA de *VDR* en los fibroblastos primarios y los niveles de RNA de *CYP24A1* que se alcanzan tras el tratamiento de los mismos con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Figura 15D). Sin embargo, se han descrito otros factores (represión posttranscripcional de *VDR* por miRNAs, elevada expresión de correpresores de *VDR*, alta actividad basal de *CYP24A1*, etc) que reducen la respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ independientemente de los niveles de expresión de RNA de *VDR* en diferentes sistemas [66, 177, 231], y que podrían explicar la baja inducción de *CYP24A1* observada tras el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en algunos cultivos primarios con alta expresión de *VDR* (valores en la esquina inferior derecha de la Figura 15D).

Hemos comparado la expresión de RNA de *VDR* de los cultivos primarios y de las líneas celulares establecidas de fibroblastos utilizadas en esta Tesis con la expresión observada en líneas celulares de distintos orígenes que responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [89, 120, 247] y en tejidos considerados de alta (intestino delgado, colon, riñón) o baja (músculo esquelético, corazón, hígado) expresión de *VDR* [254, 255] (Tabla 2). Los niveles máximos de RNA de *VDR* en NFs y en CAFs son similares a los existentes en las células de CRC HCT116 y CACO2, mientras que los niveles inferiores detectados en NFs y en CAFs son comparables a los de las células de leucemia monocítica THP1, siendo todas ellas líneas celulares que responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Además, las medianas de la expresión de *VDR* en NFs y en CAFs son similares a los niveles observados en los fibroblastos CCD18Co de colon, IMR90 de pulmón, y BJ-hTERT de piel. En relación con los tejidos, las medianas de la expresión de *VDR* en NFs y en CAFs son equivalentes a la expresión detectada en el riñón, uno de los principales tejidos diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y los cultivos primarios que menos *VDR* expresan presentan niveles 3 veces superiores a los del hígado y el corazón y 8 veces superiores a los del músculo esquelético. Estos resultados indican que la expresión de *VDR* en los NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC se encuentra dentro de los valores de otros tipos celulares y tejidos que responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aun presentando cierta variabilidad entre pacientes debido probablemente a sus diferentes características individuales.

El análisis por inmunohistoquímica realizado en la serie de pacientes con CRC metastásico indica que *VDR* se expresa en las células de carcinoma y en el estroma de los tumores colorrectales, presentando variaciones en sus niveles de expresión en cada compartimento entre los distintos

pacientes. Aproximadamente el 74,5% de los tumores muestran bajos niveles de VDR en el compartimento de carcinoma, resultado que concuerda con trabajos anteriores en los que se analizaba la expresión de VDR en tumores colorrectales mediante RT-qPCR o *Western Blot*. De nuevo, en estos trabajos no se definían los diferentes compartimentos dentro del tumor, apuntando a que la expresión de VDR detectada en ellos correspondería mayoritariamente a las células de carcinoma [5, 6, 116, 120, 133, 172, 175]. Los datos obtenidos por inmunohistoquímica en la serie de pacientes con CRC metastásico muestran que el 27,4% de los tumores presentan altos niveles de VDR en el estroma, mientras que un 72,6% presentan bajos niveles, careciendo en algún caso de expresión. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, todos los cultivos primarios de CAFs establecidos a partir de biopsias de pacientes con CRC expresan RNA de VDR. Esta discrepancia puede deberse a que los cultivos primarios de CAFs derivan de pacientes con CRC en diferentes estadios, en su mayoría no metastásicos, y sin embargo los pacientes de la serie utilizada para el análisis mediante inmunohistoquímica son todos metastásicos. Por otro lado, la técnica utilizada para la detección de VDR en los dos tipos de análisis es diferente (RT-qPCR e inmunohistoquímica), pudiendo la mayor sensibilidad de la RT-qPCR ser también la responsable de la discrepancia observada.

La expresión de VDR en otros tipos celulares del estroma de los tumores colorrectales como las células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos y células inmunes distintas a los linfocitos (macrófagos, mastocitos, etc) no se ha estudiado en esta Tesis.

2. VDR como factor pronóstico en cáncer colorrectal

Aunque muchos trabajos han analizado la expresión de VDR en CRC, muy pocos han descrito la existencia de correlaciones entre la expresión de VDR y las características clinicopatológicas de los pacientes. En 1994, Vandewalle y colaboradores mostraron que la expresión elevada de VDR en tumores colorrectales se asocia con ausencia de afectación de nódulos linfáticos y un estadio menos avanzado de los pacientes [246]. Posteriormente, Evans y colaboradores describieron que altos niveles de RNA de VDR se asocian con un mayor grado de diferenciación del tumor y una supervivencia más larga en un serie de 44 pacientes con CRC, proponiendo así a VDR como un marcador de pronóstico favorable en esta neoplasia [60]. La correlación directa entre la expresión de VDR y el grado de diferenciación del tumor se ha confirmado posteriormente en varios trabajos de nuestro grupo [120, 175]. Sin embargo, como se ha indicado en el apartado anterior, estos estudios analizan de forma global la expresión de VDR en toda la masa tumoral.

En esta Tesis hemos estudiado mediante inmunohistoquímica la expresión de VDR en tejido tumoral de una serie muy amplia de pacientes con CRC metastásico (n = 658), y analizado las correlaciones entre la expresión de VDR en los distintos compartimentos del tumor y las características clinicopatológicas de los pacientes. Así, este trabajo constituye la primera descripción

de que una alta expresión de VDR en los fibroblastos del estroma tumoral correlaciona con una mayor supervivencia (OS y PFS) de los pacientes con CRC metastásico (**Figura 25A**). Además, el análisis multivariante de regresión de Cox indica que la expresión de VDR en los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales es un factor pronóstico independiente para la OS, existiendo una fuerte tendencia cercana a la significancia estadística en el caso de la PFS (**Tablas 12 y 13**). Los resultados obtenidos muestran también que niveles elevados de VDR en las células de carcinoma se asocian a una mayor OS (aunque no PFS) de los pacientes (**Figura 25A**), lo que está en consonancia con lo descrito por Evans y colaboradores al analizar de forma global la expresión de RNA de VDR en tejido tumoral de un número reducido de pacientes con CRC [60].

Los fibroblastos son el componente celular más abundante, pero no el único, del estroma tumoral [9, 20, 178, 213, 233], por lo que también analizamos la posible asociación entre la expresión de VDR en los linfocitos estromales y la supervivencia de los pacientes con CRC metastásico, sin encontrar asociaciones significativas en este caso (**Figura 25A**).

A la vista de que tanto la expresión de VDR en las células de carcinoma como en los fibroblastos estromales correlaciona con la supervivencia de los pacientes con CRC metastásico, analizamos la supervivencia de dichos pacientes teniendo en cuenta sus niveles de expresión de VDR en ambos compartimentos. Aquellos pacientes con alta expresión de VDR en las células de carcinoma y en los fibroblastos estromales tienen una OS significativamente más larga (**Figura 25B**). Sin embargo, esto no se observa en el caso de la PFS (**Figura 25B**), probablemente debido a la ausencia de asociación entre la expresión de VDR en las células de carcinoma y la PFS (**Figura 25A**).

Por otro lado, la mutación de *BRAF* y el fenotipo de MSI son dos importantes factores pronóstico (negativo y positivo, respectivamente) en CRC [180, 261], por lo que procedimos a estudiarlos en la serie de 658 pacientes con CRC metastásico. Observamos que la asociación entre la expresión de VDR en los fibroblastos estromales y la OS se mantiene en los pacientes con *BRAF* no mutado y en aquellos con o sin fenotipo de MSI, existiendo una tendencia cercana a la significancia estadística en los pacientes con *BRAF* mutado (**Figura 26A y B**). Estos datos sugieren que la asociación entre la expresión de VDR en los fibroblastos estromales y la supervivencia de los pacientes es general y refuerzan la importancia de VDR como factor pronóstico en esta neoplasia.

La expresión de VDR en las células de carcinoma o en los fibroblastos estromales no se asocia con ninguna otra característica clinicopatológica de la serie de 658 pacientes (**Tabla 14**). Del mismo modo, tampoco encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de RNA de VDR en los cultivos primarios de CAFs y las características clinicopatológicas de los pacientes de los que derivan, probablemente debido a que el número de pacientes (n = 32) es muy reducido para éste tipo de análisis.

3. La 1,25(OH)₂D₃ inhibe las propiedades protumorales de los fibroblastos

Los CAFs promueven la progresión tumoral desde estadios premalignos, estimulan la metástasis y favorecen el crecimiento de las células tumorales en los focos metastásicos [9]. Estas acciones están en parte mediadas por su habilidad para sintetizar, remodelar y contraer la ECM [13, 95, 157, 165, 198, 213, 214, 253]. A través de la remodelación de la ECM y de la secreción de factores de crecimiento y citoquinas, los CAFs reclutan otras células al entorno tumoral, y promueven la migración e invasión de las células tumorales facilitando así la metástasis [157]. De acuerdo con esto, varios trabajos han descrito la capacidad de los CAFs colónicos de contraer la ECM e inducir la migración de las células de CRC [19, 95].

Nuestros datos indican que la 1,25(OH)₂D₃ inhibe dos propiedades protumorales características de los fibroblastos. Por un lado, la 1,25(OH)₂D₃ reduce la capacidad de contraer geles de colágeno de los NFs y de los CAFs derivados de pacientes con CRC (1,9 y 1,3 veces, respectivamente) (Figura 16), lo que implica una inhibición de la activación de estas células. Todos los cultivos primarios analizados muestran inhibición, aunque con cierta variabilidad en la intensidad del efecto, en la contracción de los geles de colágeno por 1,25(OH)₂D₃, a excepción de los CAFs del paciente 44. Por otro lado, estudiamos el efecto de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la capacidad de los NFs y de los CAFs de inducir la migración de células de CRC. El pretratamiento de los NFs y de los CAFs con 1,25(OH)₂D₃ reduce el efecto inductor de los fibroblastos primarios sobre la migración de las células de CRC (Figura 17). Al igual que en los ensayos de contracción de geles de colágeno, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe, aunque con intensidad variable, esta capacidad en todos los cultivos primarios analizados, a excepción de los NFs del paciente 11. La media refleja que la inhibición es de aproximadamente un 20% en NFs y en CAFs. Las variaciones observadas en la respuesta a 1,25(OH)₂D₃ de los distintos cultivos primarios en cada ensayo pueden ser debidas a características específicas de los pacientes como por ejemplo diferencias en la expresión de VDR, o en otros factores del sistema de respuesta celular a 1,25(OH)₂D₃ (actividad de CYP24A1, balance entre coactivadores y correpresores de VDR, etc), o a otras causas no relacionadas con dicho sistema.

La comparación de la respuesta a 1,25(OH)₂D₃ de cada uno de los cultivos primarios en ambos ensayos muestra que los NFs del paciente 45 son los segundos que mejor responden en los dos ensayos y los NFs del paciente 27 los séptimos (Figuras 16 y 17). Algo similar ocurre con los NFs del paciente 17 y con los CAFs de los pacientes 11, 16, 38 y 43. Sin embargo, otros cultivos primarios como los NFs del paciente 11 y los CAFs de los pacientes 17, 27 y 44 muestran importantes diferencias en el efecto ejercido por la 1,25(OH)₂D₃ en cada uno de los dos ensayos. Estas variaciones se deberán probablemente a factores independientes del sistema de respuesta celular a 1,25(OH)₂D₃, pudiendo ser dependientes del proteoma (conjunto de proteínas) específico que expresa cada cultivo primario de fibroblastos.

Los resultados de los ensayos de contracción de geles de colágeno realizados con los NFs y los CAFs de colon concuerdan con los obtenidos usando las líneas celulares establecidas de fibroblastos de distintos tejidos IMR90, BJ-hTERT y NIH3T3, en los que observamos que la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la capacidad de contraer geles de colágeno de las tres líneas celulares, siendo el efecto más pronunciado en el caso de los fibroblastos NIH3T3 (**Figura 12**). La 1,25(OH)₂D₃ también inhibe otras propiedades protumorales de estas líneas celulares de fibroblastos como son su capacidad proliferativa, migratoria e invasiva (**Figuras 9, 10 y 11**). Por todo esto, la inhibición de las propiedades protumorales parece ser una acción general de la 1,25(OH)₂D₃ sobre los fibroblastos de cualquier tejido.

4. La 1,25(OH)₂D₃ ejerce una profunda regulación de la expresión génica en los NFs y CAFs derivados de pacientes con cáncer colorrectal

La 1,25(OH)₂D₃ es un importante regulador de la expresión génica. Previamente, nuestro grupo y otros han descrito los efectos de la 1,25(OH)₂D₃ sobre el patrón de expresión génica de células de CRC [173, 257]. Sin embargo, no se ha publicado ningún trabajo que realice un estudio de expresión génica global en fibroblastos primarios de colon humano tratados con 1,25(OH)₂D₃.

Nuestros resultados revelan que la 1,25(OH)₂D₃ tiene un profundo efecto sobre la expresión génica de NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC. En ambos tipos celulares, el tratamiento con 1,25(OH)₂D₃ durante 48 h modula la expresión de un elevado número de genes (958 en NFs y 1.489 en CAFs), que son parcialmente coincidentes (**Figura 18B**). El análisis detallado de los genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en los NFs sugiere que la 1,25(OH)₂D₃ podría participar en el mantenimiento de la homeostasis colónica, ya que modula la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular (induce *FN1*, *FZD1*, *LAMB3*, *MGP*, *PPL*; reprime *NOTCH3*, *S100A4*, *ITGA4*, *LAMA1*, *LAMA5*), la remodelación tisular (induce *BMP4*, *TIMP3*, *HMCN1*, *TGFB3*; reprime *MMP3*, *COL4A1*, *COL14A1*, *COL13A1*, *COL6A3*, *MASP1*), la cicatrización de heridas (induce *FN1*, *THBD*, *SERPING1*; reprime *TFPI2*, *PLAT*, *ITGB3*), el desarrollo de vasos sanguíneos (induce *EFNB2*, *VEGFA*, *VEGFC*; reprime *COL5A1*, *FGF2*, *ITGA7*), y la respuesta inflamatoria (induce *PTGER3*, *CD97*, *LY96*; reprime *CCL11*, *CCL13*, *CCL2*, *CCL26*, *CCL7*, *CCL8*, *IL8*) (**Tablas 7 y 8**).

Los CAFs contribuyen a la progresión tumoral modulando la composición y organización de la ECM y secretando factores solubles que actúan de forma autocrina y/o paracrina, y afectan no solo a las células de carcinoma, sino también a otros tipos celulares del estroma tumoral [9, 20, 83, 178, 213]. Aproximadamente el 15% de los genes regulados por 1,25(OH)₂D₃ en los CAFs se clasifican como componentes de la región extracelular, incluyendo factores de crecimiento (induce *IGF1*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFA*; reprime *FGF1*, *FGF2*, *HDGF*, *LTBP4*, *TGFA*), citoquinas (reprime *CCL11*, *CCL13*, *CCL16*, *CCL2*, *CXCL10*, *CKLF*, *IL8*), y constituyentes y proteínas modificadoras de la ECM (induce

TIMP3, FMOD, MMP1, NID2; reprime *COL5A2, COL5A3, COL6A3, COL8A2, COL11A2, ECM1, MMP2*). Nuestros resultados indican que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula en estas células la expresión de 12 genes que codifican quimioquinas. La función más general de las quimioquinas es el reclutamiento de células inmunes a los sitios de inflamación y se ha descrito que muchas de ellas contribuyen a la patogénesis de la colitis ulcerosa y del CRC [43]. Por tanto, a través de la regulación de la expresión de estos genes en los CAFs, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podría indirectamente alterar el reclutamiento de linfocitos o de otras células inmunes al estroma tumoral y modular sus propiedades y fisiología. Las quimioquinas y otros factores secretados por los CAFs pueden asimismo afectar a las células de carcinoma [9, 20, 178, 213, 233], y podrían mediar el efecto inhibitorio de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la capacidad de los NFs y de los CAFs de inducir la migración de células de CRC (Figura 17). También se ha descrito que los factores secretados por los CAFs pueden actuar de forma autocrina sobre los mismos y modular sus propiedades y fenotipo, y por ejemplo promover su propia migración [30, 135, 202, 204]. Por lo tanto, es posible que las quimioquinas y factores secretados identificados en el estudio de expresión génica global actúen autocrinamente sobre los propios fibroblastos, y por tanto, puedan estar mediando los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos colónicos (Figura 16), como hemos demostrado en el caso de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 (Figura 21B).

Durante el desarrollo de esta Tesis se ha descrito que NFs y CAFs derivados de pacientes con cáncer de mama expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con la inducción de la expresión de *CYP24A1* [25, 113, 147]. Además, Campos y colaboradores han analizado el efecto del tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durante 24 h sobre el patrón de expresión génica de NFs y CAFs derivados de 5 pacientes con cáncer de mama [25]. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modula la expresión de 126 y 123 genes en NFs y en CAFs, respectivamente, existiendo un solapamiento del 50% entre los genes regulados en cada tipo celular. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce en los NFs de mama genes antiapoptóticos, de detoxificación, del sistema de defensa antibacteriana y de protección contra el estrés oxidativo, mientras que los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los CAFs de mama están predominantemente implicados en la proliferación celular (genes reprimidos por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) y en la modulación del sistema inmune (genes inducidos por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), lo que concuerda con la propuesta acción antitumoral de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en esta neoplasia [25]. Es de destacar que 6 de los genes que se regulan por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exclusivamente en los NFs de mama están también incluidos entre los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exclusivamente en los NFs de colon: 5 de ellos (*CYP3A5, CRIP1, RAB8B, FIGF* y *SERPINB9*) se regulan en la misma dirección, mientras que en el caso de *LRIG1* la regulación observada en los dos sistemas es opuesta. Asimismo, 4 genes (*MTSS1* y *PTCH1*, inducidos; y *F2RL2* y *WNT5A*, reprimidos) se regulan por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ solo en los CAFs de ambas neoplasias. De los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en NFs y en CAFs 26 genes coinciden en ambos sistemas, entre los que se incluyen *APBB1IP, CLMN, CYP24A1*,

EFTUD1, *GOS2*, *HMCN1*, *IGF1*, *MAPK13*, *NID2* y *ZFP36*. Adicionalmente, muchas de las funciones en las que están implicados los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los NFs y CAFs derivados de ambos tejidos son similares, por ejemplo proliferación, apoptosis, adhesión celular y regulación de procesos metabólicos en NFs, y proliferación, apoptosis, respuesta a vitamina y respuesta a cicatrización en CAFs. Esto sugiere que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce un programa de expresión génica parcialmente coincidente en los NFs y CAFs procedentes de distintos tejidos, y que, por tanto, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ también podría tener un efecto inhibitorio sobre las propiedades protumorales de los CAFs de otras neoplasias.

5. Papel de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 en la acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los fibroblastos colónicos

Para caracterizar si los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identificados en el estudio de *microarrays* están implicados en la inhibición que ésta ejerce sobre las acciones protumorales de los fibroblastos colónicos, y teniendo en cuenta la importancia de las quimioquinas como moduladores de la señalización intercelular, seleccionamos para su estudio las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13. Estas quimioquinas se inhiben por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los NFs y en los CAFs derivados de pacientes con CRC (**Figura 19**), así como en la línea celular establecida de fibroblastos normales de colon humano CCD18Co (**Figura 21A**).

La quimioquina CCL2 (o MCP1) está implicada en el reclutamiento de células mieloides a las zonas de inflamación y a los tumores, y numerosos trabajos muestran su importancia en CRC. Tanaka y colaboradores observaron que los tumores colorrectales liberan CCL2, cuya expresión aumenta con el grado tumoral. CCL2 está involucrada en la acumulación de macrófagos en el entorno tumoral y en el aumento de la expresión de COX-2 en las células tumorales [228]. De acuerdo con esto, se ha descrito que los niveles intratumorales de CCL2 se elevan en pacientes con adenomas de colon, CRC y CRC asociado a colitis, y que su delección (*Ccl2*^{-/-}) o neutralización inhibe la tumorigénesis en modelos de CRC en ratón [43, 143]. Asimismo, alta expresión de CCL2 y presencia de macrófagos en el entorno tumoral correlacionan con estadios avanzados y mal pronóstico en CRC [10, 100, 143]. Además, se ha descrito que el reclutamiento de macrófagos mediado por CCL2 promueve el crecimiento tumoral y la metástasis en cáncer de mama, ovario y próstata [61, 185, 265], y que los CAFs de carcinoma hepatocelular secretan altos niveles de CCL2 que promueve la metástasis a través de la activación de la vía de señalización Hedgehog en las células de carcinoma [131].

El papel de CCL11 (o eotaxina-1) en cáncer no se conoce bien. Por un lado, tiene una acción quimioatrayente sobre eosinófilos, basófilos, linfocitos Th2 y mastocitos actuando a través de su receptor CCR3 [98, 195, 201]. Ello puede suponer un efecto antitumoral en CRC, ya que una elevada infiltración eosinofílica se considera un indicador de pronóstico favorable en esta neoplasia [68, 182].

Sin embargo, CCL11 actúa también sobre las células endoteliales CCR3⁺ y promueve la angiogénesis [199]. Los escasos estudios publicados de expresión de CCL11 en CRC arrojan resultados contradictorios. Wagsater y colaboradores describen sobreexpresión de CCL11 en fibroblastos, linfocitos y macrófagos estromales de tumores colorrectales [251], mientras que Berdiel-Acer y colaboradores muestran que los CAFs derivados de pacientes con CRC expresan niveles inferiores de CCL11 que los NFs procedentes del mismo paciente [17]. En concordancia con nuestros resultados, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la inducción de CCL11 promovida por IL-1β en fibroblastos aislados de pólipos nasales [252], y los niveles séricos de CCL11 se reducen en pacientes de leucemia linfocítica crónica tratados con vitamina D₃ [114].

La quimioquina CCL13 es un quimioatrayente de monocitos y está implicada en reacciones alérgicas. Se ha descrito que los macrófagos alveolares de pacientes asmáticos expresan mayores niveles de CCL13 que los procedentes de individuos sanos, habiéndose propuesto como biomarcador de asma [108, 256]. Sin embargo, el papel de CCL13 en cáncer no se conoce.

Con intención de identificar la importancia que la inhibición de estas quimioquinas pudiera tener para la acción de la 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos colónicos, realizamos como primer abordaje ensayos de contracción de geles de colágeno empleando los fibroblastos CCD18Co. Observamos que el tratamiento combinado con las quimioquinas recombinantes y 1,25(OH)₂D₃ reduce la inhibición que ejerce la 1,25(OH)₂D₃ sobre esta propiedad protumoral de los fibroblastos (**Figura 21B**). Por tanto, la represión de estas quimioquinas por 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos colónicos parece mediar la acción de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la mencionada capacidad de los fibroblastos. Dada la importancia de estas quimioquinas en la señalización intercelular, analizamos a continuación su posible implicación en la acción de la 1,25(OH)₂D₃ sobre la capacidad de los fibroblastos de inducir la migración de las células de CRC. Sin embargo, la reducida capacidad promigratoria de los fibroblastos CCD18Co sobre las células SW480-ADH impidió la realización de este estudio, y hace necesaria la búsqueda de un modelo celular más adecuado para este ensayo.

Aunque en este trabajo no hemos estudiado los niveles de expresión en los fibroblastos colónicos de los receptores de las quimioquinas utilizadas para los ensayos de colágeno, y sería recomendable su análisis en un futuro, en la literatura está descrito que fibroblastos humanos de diferentes orígenes expresan algunos de los receptores para estas citoquinas como CCR2 y CCR3 [30, 75, 259]. Además, se han descrito acciones de CCL2 independientes del receptor CCR2 en fibroblastos de pulmón humano, y también en células de músculo liso arterial derivadas de ratones *Ccr2*^{-/-} [109, 205].

6. Comparación del patrón de expresión génica de NFs y CAFs y de su respuesta a 1,25(OH)₂D₃

Durante el desarrollo de esta Tesis, diversos trabajos han comparado las propiedades biológicas y el patrón de expresión génica de NFs y CAFs de colon [17-19, 237]. Berdiel-Acer y colaboradores

describieron que el medio condicionado procedente de CAFs derivados de pacientes con CRC incrementa el potencial migratorio y la capacidad clonogénica de líneas celulares de CRC en mayor medida que el medio condicionado de los NFs pareados. Además, la coinyección de CAFs junto con la línea celular de CRC DLD1 en ratones inmunosuprimidos potencia el crecimiento tumoral en comparación con la coinyección de NFs o con la inyección exclusiva de las células tumorales [19]. Los autores definieron una firma de expresión génica constituida por 108 genes diferencialmente expresados entre NFs y CAFs, y observaron que los CAFs que presentan una mayor expresión de la firma migran más en ensayos de reparación de herida y su medio condicionado provoca una mayor inducción de la proliferación de las células de CRC [19]. Por otro lado, Torres y colaboradores aislaron NFs y CAFs a partir de tejido colónico de ratones normales o de ratones con tumorigénesis colónica inducida por el tratamiento con azoximetano y sulfato sódico de dextrano. La comparación del proteoma de ambos tipos de fibroblastos les permitió describir que los CAFs expresan una firma proinflamatoria con altos niveles de expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL8 (entre otras), y que dichas quimioquinas promueven la migración y la invasión de las células de CRC [237]. Herrera y colaboradores establecieron CAFs a partir de muestras procedentes de 15 pacientes con CRC y los clasificaron según su capacidad promigratoria sobre la línea celular de CRC LIM1215, observando que la capacidad promigratoria de los CAFs correlaciona con la expresión de marcadores de fibroblastos activados y de genes de troncalidad, así como con otras propiedades de fibroblastos activados como la capacidad para contraer geles de colágeno [95].

El diseño experimental en esta Tesis se ha enfocado al estudio del efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en los NFs y en los CAFs, y no a la comparación entre ambos tipos celulares. Sin embargo, los datos generados en algunos de los experimentos revelan la existencia de diferencias entre ellos. Como era de esperar, observamos que los CAFs expresan niveles significativamente más altos de RNA de los marcadores de fibroblastos activados $\alpha\text{-SMA}$ y $\text{FAP-}\alpha$ (datos no mostrados). Además, nuestro análisis de expresión génica global identificó 34 genes diferencialmente expresados entre los NFs y los CAFs derivados de 7 pacientes con CRC (Tabla 6). El análisis de enriquecimiento funcional no mostró ningún término GO enriquecido significativamente en dichos genes, probablemente debido a su reducido número, que creemos puede deberse a la elevada heterogeneidad intratumoral de los fibroblastos estromales y a la variabilidad interindividual de los pacientes. Entre dichos genes cabe destacar *ITGB8* que se reprime en CAFs y está implicado en adhesión celular a proteínas de la ECM, y *NTF3* que se induce en CAFs y tiene actividad quimioatrayente. Confiando la validez de nuestros resultados, algunos de los genes inducidos (*IL7R*, *NTF3*, *KIAA1462*, *CADM1*) y reprimidos (*IL33*, *RSPO3*, *ITGB8*) en los CAFs con respecto a los NFs en nuestro análisis fueron también identificados por Berdiel-Acer y colaboradores al comparar el perfil de expresión génica de NFs y CAFs derivados de 8 pacientes con CRC [19]. Sin embargo, ninguno de los genes obtenidos en nuestro estudio

coincide con los definidos por Herrera y colaboradores como diferencialmente expresados entre CAFs de colon con alta y baja capacidad para inducir la migración de células de CRC [95].

Aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de RNA de *VDR* entre NFs y CAFs (**Figura 15A**), nuestros resultados muestran que la respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no es exactamente igual en ambos tipos celulares. En primer lugar, el efecto inhibitorio de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la capacidad de los fibroblastos para contraer geles de colágeno es significativamente mayor en los NFs que en los CAFs (**Figura 16**). Sin embargo, no se aprecian diferencias entre ambos tipos celulares en el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre su habilidad para inducir la migración de las células de CRC (**Figura 17**). A nivel de regulación de la expresión génica no se advierten diferencias en los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entre ambos tipos de fibroblastos, excepto en la inhibición de *CCL11* que es significativamente mayor en los NFs que en los CAFs (**Figura 19**), y en la inducción de *CYP24A1* que se observa una tendencia que no alcanza la significancia estadística hacia una mayor inducción en los CAFs (probablemente debido a que sus niveles basales son más bajos) (**Figura 15C**). Estos datos indican que ambos tipos de fibroblastos responden de forma bastante similar a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aunque presentan diferencias en algunos ensayos concretos que podrían deberse a alteraciones existentes entre NFs y CAFs probablemente no relacionadas con el sistema de respuesta celular a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

A pesar de que el número de genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identificados en el estudio de *microarrays* es mayor en los CAFs que en los NFs (1.489 y 958 genes, respectivamente), muchos de los términos GO significativamente enriquecidos en dichos genes diana son coincidentes o muy similares (**Tablas 7, 8, 9 y 10**). Sin embargo, otros términos como respuesta a nutrientes y regulación de la osificación solo aparecen significativamente enriquecidos en los NFs, mientras que respuesta a hipoxia aparece enriquecido solo en los CAFs. Respecto a los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ solo en los CAFs (1.069 genes), el análisis de enriquecimiento funcional muestra que únicamente dos términos GO están significativamente enriquecidos en dichos genes, ambos relacionados con la ECM (datos no mostrados); mientras que los genes regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exclusivamente en los NFs (538 genes) están enriquecidos en los dos términos GO antes mencionados y en otros 14 términos, tales como respuesta a estímulos externos, cicatrización, biosíntesis y metabolismo del colesterol y del esteroide, y otros (datos no mostrados). Por otro lado, 33 términos GO están enriquecidos en los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ comunes en NFs y en CAFs (420 genes), entre los que se encuentran diferenciación y proliferación celular, procesos de desarrollo, desarrollo de tejidos y órganos, colágeno, citoquinas, quimioquinas, y región extracelular (datos no mostrados). Estos resultados indican que aunque muchos de los genes diana de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en NFs y en CAFs son diferentes, las funciones en las que dichos genes están implicadas son, en su mayoría, similares. Por tanto, parece que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula de forma análoga la biología de los NFs y de los CAFs, aunque en ambos

tipos de fibroblastos, y especialmente en el caso de los NFs, la regulación común se complementa con otras funciones adicionales.

7. La expresión de los genes diana de 1,25(OH)₂D₃ *CD82* y *S100A4* en el estroma tumoral se asocia con la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal

Con el fin de caracterizar la importancia que el patrón de expresión génica impuesto por la 1,25(OH)₂D₃ en los fibroblastos primarios pueda tener en CRC, seleccionamos dos genes diana de 1,25(OH)₂D₃ identificados en el análisis de expresión génica global y validados por RT-qPCR (*CD82* y *S100A4*) para su estudio por inmunohistoquímica en la serie de pacientes con CRC metastásico.

CD82 codifica una glicoproteína de membrana de la familia de las tetraspaninas implicada en múltiples procesos celulares [57, 268]. Se ha descrito que *CD82* promueve la adhesión y polaridad celular, reduce la migración e invasión, y modula la proliferación, la apoptosis y la senescencia [67, 258]. La expresión de *CD82* disminuye a lo largo de la progresión de distintos tipos de carcinomas, y su pérdida de expresión conlleva la aparición de metástasis, por lo que se ha propuesto a *CD82* como un gen supresor de metástasis. Nuestros resultados indican que la 1,25(OH)₂D₃ induce la expresión de RNA de *CD82* en los NFs y en los CAFs derivados de pacientes con CRC (Figura 19), y que la expresión de proteína de *CD82* en los fibroblastos del estroma de los tumores colorrectales correlaciona directamente con la expresión de VDR en dichas células (Figura 27B) y con la OS de los pacientes con CRC metastásico (Figura 27C).

S100A4 codifica una proteína pequeña de unión a Ca²⁺ de la familia S100 [56, 90, 139] presente en una amplia variedad de tejidos, y cuya expresión aumenta en muchos tipos de cánceres [105, 225]. Además, *S100A4* es un marcador de fibroblastos activados [9, 190] y su sobreexpresión correlaciona con mal pronóstico en CRC [44, 81, 132]. Nuestros datos indican que la expresión de RNA de *S100A4* se inhibe por 1,25(OH)₂D₃ en los NFs y en los CAFs derivados de pacientes con CRC (Figura 19), y que la expresión de proteína de *S100A4* en los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales correlaciona inversamente con la expresión de VDR en dichas células (Figura 27B) y con la OS de los pacientes con CRC metastásico (Figura 27C).

Estos resultados muestran que la 1,25(OH)₂D₃ modifica el patrón de expresión génica de los fibroblastos de colon modulando la expresión de genes que se asocian con la supervivencia de los pacientes con CRC metastásico, y por tanto, apoyan que los efectos de la 1,25(OH)₂D₃ sobre los fibroblastos estromales están implicados en la acción antitumoral de la 1,25(OH)₂D₃ en CRC.

8. Expresión de VDR y efectos de la 1,25(OH)₂D₃ en distintos tipos de fibroblastos

Varios trabajos han analizado la expresión de VDR y la acción de la 1,25(OH)₂D₃ en diferentes líneas celulares establecidas de fibroblastos y en cultivos primarios de fibroblastos de distintos orígenes.

Los estudios más antiguos muestran que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la proliferación de fibroblastos cutáneos derivados de tejido sano y de fibroblastos embrionarios de ratón normales y transformados mediante el tratamiento con carcinógenos químicos [21, 32]. Durante el desarrollo de esta Tesis se han publicado los primeros trabajos que estudian el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre los fibroblastos del estroma tumoral. Así, se ha descrito que NFs y CAFs derivados de pacientes con cáncer de próstata y de mama expresan VDR y responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con la inducción de la expresión de *CYP24A1* y/o la activación de VDREs en construcciones reporteras [25, 96, 97, 113, 147]. Sin embargo, estos trabajos no analizan efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la biología, las propiedades protumorales, o el fenotipo de dichos fibroblastos. Recientemente, Sherman y colaboradores han mostrado que VDR se expresa en las células estrelladas del páncreas (PSCs; principal componente celular del estroma tumoral en cáncer de páncreas) y que el tratamiento con el análogo de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ calcipotriol promueve la reprogramación de las PSCs activadas y transdiferenciadas a miofibroblastos en PSCs quiescentes, reduciendo así la expresión marcadores de inflamación y de fibrosis. Esta reprogramación de las PSCs inducida por el calcipotriol reduce la cantidad de ECM presente en el tumor, lo que aumenta la concentración intratumoral y la eficacia de la quimioterapia convencional en un modelo de cáncer de páncreas en ratón. Así, la combinación de quimioterapia y calcipotriol resulta en una reducción del volumen tumoral en el 70% de los ratones y en un incremento del 57% en la supervivencia de los mismos en comparación con el tratamiento exclusivo con quimioterapia [211].

Nuestro trabajo es, por tanto, el primero en describir que los NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC expresan VDR (**Figura 15A**) y que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe sus propiedades protumorales (**Figuras 16 y 17**). Además, hemos mostrado que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la proliferación (**Figura 9**), la migración (**Figura 10**), la invasión (**Figura 11**), y la activación (contracción de geles de colágeno) (**Figura 12**) de fibroblastos de diferentes orígenes. En conjunto, estos datos indican que pese a ser un tipo celular muy heterogéneo, los fibroblastos son mayoritariamente sensibles a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Diversos estudios han descrito que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la vía de señalización de TGF- β en fibroblastos de diferentes orígenes y en patologías, principalmente fibróticas, de las que el TGF- β es un potente inductor. El tratamiento de dichos fibroblastos con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o sus análogos inhibe la estimulación promovida por TGF- β de la contracción de geles de colágeno y de la expresión de marcadores de fibroblastos activados como α -SMA y de otras proteínas relacionadas con dicho fenotipo como fibronectina, colágeno tipo I, trombospondina-1, plasminógeno-1 y MMP-9. En definitiva, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- β [126, 128, 145, 189, 217, 262, 264]. Liu y colaboradores han descrito el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sus análogos en un modelo murino de fibrosis renal. Estos compuestos disminuyen la deposición de colágeno y fibronectina y reprimen la expresión de Snail1, α -Sma, β -catenina, Tgf- β 1 y su receptor de

tipo I, reduciendo además la localización nuclear de β -catenina, y aumentan los niveles de Vdr y E-cadherina en el riñón de estos animales. Asimismo, el tratamiento con análogos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la sobreexpresión de VDR en células epiteliales de los túbulos renales bloquean la EMT promovida en dichas células por TGF- β 1, mientras que el silenciamiento de VDR aumenta la sensibilidad de las células a TGF- β 1 [226, 227, 260].

Ding y colaboradores han descrito el mecanismo por el cual la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la fibrosis hepática. VDR activado por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antagoniza la transcripción de genes profibróticos dependiente de TGF- β en las células estrelladas del hígado, principales responsables de esta patología. TGF- β cambia los sitios de unión al DNA de VDR activado por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, promoviendo su asociación a los sitios de unión de SMAD3 en las regiones reguladoras de los genes profibróticos. Esto disminuye la ocupación de estos sitios por SMAD3, causando el silenciamiento transcripcional de dichos genes y, por tanto, inhibiendo la fibrosis [55]. Adicionalmente, Zerr y colaboradores han descrito en fibroblastos de esclerosis sistémica que el análogo de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ paricalcitol estimula la formación de complejos entre VDR y fosfo-SMAD3 e inhibe la transcripción dependiente de SMAD3, actuando así como un regulador negativo de la ruta de señalización TGF- β /SMAD. Por tanto, una expresión reducida de VDR o bajos niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podrían contribuir a una señalización elevada de TGF- β y a la activación aberrante de fibroblastos en estas patologías [262]. De acuerdo con esto, una dieta rica en vitamina D_3 reduce la fibrosis intestinal en ratones con colitis crónica a través de la inhibición de la vía TGF- β /SMAD en los miofibroblastos subepiteliales del colon por disminución de los niveles de TGF- β 1, SMAD3 y fosfo-SMAD3 [230].

En resumen, numerosas evidencias indican que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sus análogos protegen frente a la fibrosis en diferentes tejidos inhibiendo la acción profibrótica del TGF- β . Sorprendentemente, aunque estos trabajos muestran la importancia de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como antagonista de la vía de señalización de TGF- β , esta ruta no aparece en los análisis de enriquecimiento funcional realizados con los datos de expresión génica global de NFs y CAFs de colon tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A pesar de ello, creemos que debido a la importancia de esta vía en CRC sería interesante estudiar el efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en NFs y CAFs de colon tras su estimulación con TGF- β .

9. Implicaciones clínicas de la acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre los fibroblastos del estroma tumoral en cáncer colorrectal

Los resultados obtenidos en esta Tesis amplían el conocimiento sobre los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en CRC, ya que indican que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce su acción antitumoral en esta neoplasia no solo actuando directamente sobre las células de carcinoma [66, 171, 177], sino también a través de la inhibición de las propiedades protumorales de los fibroblastos del estroma tumoral. De acuerdo con esto, nuestro estudio cambia la visión existente respecto a la utilización clínica de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y

sus análogos, ya que debido a la pérdida de expresión de VDR observada en un porcentaje elevado de CRC avanzados [7, 39, 40, 60, 120, 142, 151, 172, 175, 209] se había propuesto que la aplicabilidad de estos compuestos estaba restringida a la prevención en la población sana, y especialmente en individuos con alto riesgo de CRC, y al tratamiento de pacientes con CRC en estadios tempranos [51, 121]. Nuestros datos muestran que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene efectos antitumorales adicionales en CRC actuando sobre los fibroblastos del estroma tumoral y que, por tanto, la acción terapéutica de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y sus análogos se extiende a los pacientes con CRC que expresan VDR en los fibroblastos estromales independientemente de los niveles de expresión de VDR en las células de carcinoma. Habida cuenta de la gran incidencia de CRC en nuestro entorno y en todo el mundo, y de que el 27,4% de los pacientes de la serie estudiada con CRC metastásico expresan VDR en los fibroblastos del estroma tumoral, el número de pacientes que podría beneficiarse de los efectos antitumorales de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mediados por dichos fibroblastos es relevante, siendo necesario tener en cuenta estos nuevos datos para el correcto diseño de los ensayos clínicos con estos compuestos.

Además, nuestros resultados con las líneas celulares establecidas de fibroblastos de distintos orígenes, así como los de Sherman y colaboradores en cáncer de páncreas [211], sugieren que los fibroblastos del estroma tumoral podrían estar implicados en la acción antitumoral de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en otras neoplasias, entre ellas cabe destacar cáncer de mama y de próstata en los que ya se ha observado que CAFs derivados de dichos tumores expresan VDR [25, 96, 97, 113, 147]. Asimismo, nuestros datos refuerzan la relevancia del estroma y del microambiente tumoral como dianas de terapias anticancerígenas y apoyan fuertemente la consideración de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como un importante y multifacético agente antitumoral en CRC.

1. Los fibroblastos normales (NFs) y asociados a tumores (CAFs) derivados de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) y varias líneas celulares establecidas de fibroblastos de otros orígenes expresan el receptor de vitamina D (VDR) y responden a $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$).
2. La $1,25(OH)_2D_3$ inhibe las acciones protumorales de los NFs y CAFs de colon, así como de líneas celulares establecidas de fibroblastos de diferentes tejidos.
3. La $1,25(OH)_2D_3$ regula la expresión génica de los NFs y CAFs derivados de pacientes con CRC. Los genes regulados por $1,25(OH)_2D_3$ en ambos tipos de fibroblastos son parcialmente solapantes y están implicados en diversas funciones celulares.
4. La represión de las quimioquinas CCL2, CCL11 y CCL13 por $1,25(OH)_2D_3$ es necesaria para el efecto inhibitorio ejercido por la $1,25(OH)_2D_3$ sobre la capacidad de contraer geles de colágeno de los fibroblastos colónicos.
5. VDR se expresa en las células de carcinoma y en el estroma de tumores colorrectales humanos, existiendo variabilidad interindividual en sus niveles de expresión.
6. La expresión elevada de VDR en los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales es un marcador independiente de buen pronóstico en CRC metastásico, asociándose con una supervivencia más larga de los pacientes.
7. La expresión en los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales de las proteínas codificadas por los genes diana de $1,25(OH)_2D_3$ *CD82* (inducido) y *S100A4* (reprimido) se asocia directa e inversamente, respectivamente, con la expresión de VDR en dichos fibroblastos y con la supervivencia de los pacientes con CRC metastásico.

En resumen, los resultados obtenidos indican que la $1,25(OH)_2D_3$ ejerce su acción antitumoral en CRC a través de la inhibición de las propiedades protumorales de los CAFs, lo que se añade a sus efectos ya descritos sobre las células de carcinoma. De acuerdo con esto, una alta expresión de VDR en los fibroblastos estromales de los tumores colorrectales predice un pronóstico favorable en pacientes con CRC metastásico. Por tanto, el tratamiento de pacientes con CRC con $1,25(OH)_2D_3$ o alguno de sus análogos podría tener efectos terapéuticos incluso en aquellos pacientes cuyas células de carcinoma no expresan VDR.

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78:4990-4.
2. Aguilera Ó, Peña C, García JM, Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Navarro D, Barbáchano A, López de Silanes I, Ballestar E, Fraga MF, Esteller M, Gamallo C, Bonilla F, González-Sancho JM, Muñoz A. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2007, 28:1877-84.
3. Ahearn TU, Shaikat A, Flanders WD, Rutherford RE, Bostick RM. A randomized clinical trial of the effects of supplemental calcium and vitamin D3 on the APC/beta-catenin pathway in the normal mucosa of colorectal adenoma patients. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5:1247-56.
4. Alba-Castellón L, Batlle R, Franci C, Fernandez-Acenero MJ, Mazzolini R, Pena R, Loubat J, Alameda F, Rodriguez R, Curto J, Albanell J, Muñoz A, Bonilla F, Ignacio Casal J, Rojo F, García de Herreros A. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia*, 2014, 16:413-21.
5. Álvarez-Díaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombardia L, Herrera M, Domínguez O, Segura MF, Bonilla F, Hernando E, Muñoz A. MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet*, 2012, 21:2157-65.
6. Álvarez-Díaz S, Valle N, García JM, Peña C, Freije JM, Quesada V, Astudillo A, Bonilla F, López-Otín C, Muñoz A. Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J Clin Invest*, 2009, 119:2343-58.
7. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57:234-40.
8. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 2011, 21:193-215.
9. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*, 2014, 4:62.
10. Bailey C, Negus R, Morris A, Ziprin P, Goldin R, Allavena P, Peck D, Darzi A. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24:121-30.
11. Barbáchano A, Fernandez-Barral A, Pereira F, Segura MF, Ordonez-Moran P, Carrillo-de Santa Pau E, Gonzalez-Sancho JM, Hanniford D, Martinez N, Costales-Carrera A, Real FX, Palmer HG, Rojas JM, Hernando E, Munoz A. SPROUTY-2 represses the epithelial phenotype of colon carcinoma cells via upregulation of ZEB1 mediated by ETS1 and miR-200/miR-150. *Oncogene*, 2016, 35:2991-3003.
12. Barbáchano A, Ordóñez-Morán P, García JM, Sánchez A, Pereira F, Larriba MJ, Martínez N, Hernández J, Landolfi S, Bonilla F, Palmer HG, Rojas JM, Muñoz A. SPROUTY-2 and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene*, 2010, 29:4800-13.
13. Barker HE, Bird D, Lang G, Erler JT. Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res*, 2013, 11:1425-36.
14. Barnes JD, Arhel NJ, Lee SS, Sharp A, Al-Okail M, Packham G, Hague A, Paraskeva C, Williams AC. Nuclear BAG-1 expression inhibits apoptosis in colorectal adenoma-derived epithelial cells. *Apoptosis*, 2005, 10:301-11.
15. Becht E, de Reynies A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, Selves J, Sautes-Fridman C, Laurent-Puig P, Fridman WH. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2016, 22:4057-66.
16. Belorusova AY, Rochel N. Structural Studies of Vitamin D Nuclear Receptor Ligand-Binding Properties. *Vitam Horm*, 2016, 100:83-116.
17. Berdiel-Acer M, Berenguer A, Sanz-Pamplona R, Cuadras D, Sanjuan X, Paules MJ, Santos C, Salazar R, Moreno V, Capella G, Villanueva A, Mollevi DG. A 5-gene classifier from the

- carcinoma-associated fibroblast transcriptomic profile and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2014, 5:6437-52.
18. Berdiel-Acer M, Cuadras D, Díaz-Maroto NG, Sanjuan X, Serrano T, Berenguer A, Moreno V, Goncalves-Ribeiro S, Salazar R, Villanueva A, Mollevi DG. A monotonic and prognostic genomic signature from fibroblasts for colorectal cancer initiation, progression, and metastasis. *Mol Cancer Res*, 2014, 12:1254-66.
 19. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, Paules MJ, Salazar R, Moreno V, Batlle E, Villanueva A, Mollevi DG. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*, 2014, 8:1290-305.
 20. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004, 432:332-7.
 21. Brackman D, Lillehaug JR, Aksnes L, Aarskog D. Modulation of cell proliferation and cell cycle, and inhibition of cytokinesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in C3H/10T1/2 fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993, 46:155-62.
 22. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 2012, 22:571-84.
 23. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Mombalona X, Iglesias M, Sevillano M, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Byrom D, Cortina C, Morral C, Barcelo C, Tosi S, Riera A, Attolini CS, Rossell D, Sancho E, Batlle E. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2015, 47:320-9.
 24. Calon A, Tauriello DV, Batlle E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25:15-22.
 25. Campos LT, Brentani H, Roela RA, Katayama ML, Lima L, Rolim CF, Milani C, Folgueira MA, Brentani MM. Differences in transcriptional effects of 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 on fibroblasts associated to breast carcinomas and from paired normal breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 133:12-24.
 26. Cañadas I, Rojo F, Taus A, Arpi O, Arumi-Uria M, Pijuan L, Menéndez S, Zazo S, Domine M, Salido M, Mojal S, Garcia de Herreros A, Rovira A, Albanell J, Arriola E. Targeting epithelial-to-mesenchymal transition with Met inhibitors reverts chemoresistance in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2014, 20:938-50.
 27. Carlberg C. Molecular Approaches for Optimizing Vitamin D Supplementation. *Vitam Horm*, 2016, 100:255-71.
 28. Carlberg C, Seuter S. A genomic perspective on vitamin D signaling. *Anticancer Res*, 2009, 29:3485-93.
 29. Carlberg C, Seuter S, Heikkinen S. The first genome-wide view of vitamin D receptor locations and their mechanistic implications. *Anticancer Res*, 2012, 32:271-82.
 30. Carulli MT, Ong VH, Ponticos M, Shiwen X, Abraham DJ, Black CM, Denton CP. Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. *Arthritis Rheum*, 2005, 52:3772-82.
 31. Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R. Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J Cell Sci*, 1998, 111 (Pt 4):443-53.
 32. Clemens TL, Adams JS, Horiuchi N, Gilchrist BA, Cho H, Tsuchiya Y, Matsuo N, Suda T, Holick MF. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin-D3 with keratinocytes and fibroblasts from skin of normal subjects and a subject with vitamin-D-dependent rickets, type II: a model for study of the mode of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983, 56:824-30.
 33. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127:469-80.
 34. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 2011, 17:313-9.
 35. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 2013, 154:274-84.

36. Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology*, 1981, 108:1083-6.
37. Crispino P, De Toma G, Ciardi A, Bella A, Rivera M, Cavallaro G, Polistena A, Fornari F, Unim H, Pica R, Cassieri C, Mingazzini PL, Paoluzi P. Role of desmoplasia in recurrence of stage II colorectal cancer within five years after surgery and therapeutic implication. *Cancer Invest*, 2008, 26:419-25.
38. Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 2006, 7:349-59.
39. Cross HS, Bajna E, Bises G, Genser D, Kallay E, Potzi R, Wenzl E, Wrba F, Roka R, Peterlik M. Vitamin D receptor and cytokeratin expression may be progression indicators in human colon cancer. *Anticancer Res*, 1996, 16:2333-7.
40. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids*, 2001, 66:287-92.
41. Chen S, Zhu J, Zuo S, Ma J, Zhang J, Chen G, Wang X, Pan Y, Liu Y, Wang P. 1,25(OH)2D3 attenuates TGF-beta1/beta2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468:130-5.
42. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*, 2016, 96:365-408.
43. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, Odze R, Glickman JN, Garrett WS. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep*, 2015, 12:244-57.
44. Dahlmann M, Kobelt D, Walther W, Mudduluru G, Stein U. S100A4 in Cancer Metastasis: Wnt Signaling-Driven Interventions for Metastasis Restriction. *Cancers (Basel)*, 2016, en prensa.
45. De Boeck A, Hendrix A, Maynard D, Van Bockstal M, Daniels A, Pauwels P, Gespach C, Bracke M, De Wever O. Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression. *Proteomics*, 2013, 13:379-88.
46. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13:97-110.
47. de Sousa EMF, Colak S, Buikhuisen J, Koster J, Cameron K, de Jong JH, Tuynman JB, Prasetyanti PR, Fessler E, van den Bergh SP, Rodermond H, Dekker E, van der Loos CM, Pals ST, van de Vijver MJ, Versteeg R, Richel DJ, Vermeulen L, Medema JP. Methylation of cancer-stem-cell-associated Wnt target genes predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cell Stem Cell*, 2011, 9:476-85.
48. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*, 2008, 123:2229-38.
49. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, 2003, 200:429-47.
50. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J*, 2004, 18:1016-8.
51. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7:684-700.
52. DeLuca HF. Vitamin D: Historical Overview. *Vitam Horm*, 2016, 100:1-20.
53. DeLuca HF, Plum LA. Analogs of 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 in Clinical Use. *Vitam Horm*, 2016, 100:151-64.
54. Di Rosa M, Malaguarnera M, Zanghi A, Passaniti A, Malaguarnera L. Vitamin D3 insufficiency and colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 88:594-612.

55. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M, Coulter S, He M, Scott C, Lau SL, Atkins AR, Barish GD, Gunton JE, Liddle C, Downes M, Evans RM. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*, 2013, 153:601-13.
56. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 2003, 60:540-51.
57. Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, 1995, 268:884-6.
58. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009, 45:228-47.
59. Evans SR, Schwartz AM, Shchepotin EI, Uskokovic M, Shchepotin IB. Growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its synthetic analogue, 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-23yne-26,27-hexafluoro-19-nor-cholecalciferol (Ro 25-6760), on a human colon cancer xenograft. *Clin Cancer Res*, 1998, 4:2869-76.
60. Evans SRT, Nolla J, Hanfelt J, Shabahang M, Nauta RJ, Shchepotin IB. Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 1998, 4:1591-5.
61. Fader AN, Rasool N, Vaziri SA, Kozuki T, Faber PW, Elson P, Biscotti CV, Michener CM, Rose PG, Rojas-Espaillet L, Belinson JL, Ganapathi MK, Ganapathi R. CCL2 expression in primary ovarian carcinoma is correlated with chemotherapy response and survival outcomes. *Anticancer Res*, 2010, 30:4791-8.
62. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:479-507.
63. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61:759-67.
64. Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, Long Q, Shaikat A, Rutherford RE, Daniel CR, Cohen V, Dash C. Effects of vitamin D and calcium supplementation on markers of apoptosis in normal colon mucosa: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2:213-23.
65. Fedirko V, Bostick RM, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Shaikat A, Daniel CR, Rutherford RE, Woodard JJ. Effects of vitamin d and calcium on proliferation and differentiation in normal colon mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18:2933-41.
66. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14:342-57.
67. Feng J, Huang C, Wren JD, Wang DW, Yan J, Zhang J, Sun Y, Han X, Zhang XA. Tetraspanin CD82: a suppressor of solid tumors and a modulator of membrane heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34:619-33.
68. Fernandez-Acenero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer*, 2000, 88:1544-8.
69. Fichera A, Little N, Dougherty U, Mustafi R, Cerda S, Li YC, Delgado J, Arora A, Campbell LK, Joseph L, Hart J, Noffsinger A, Bissonnette M. A vitamin D analogue inhibits colonic carcinogenesis in the AOM/DSS model. *J Surg Res*, 2007, 142:239-45.
70. Findlay VJ, Moretz RE, Wang C, Vaena SG, Bandurraga SG, Ashenafi M, Marshall DT, Watson DK, Camp ER. Slug expression inhibits calcitriol-mediated sensitivity to radiation in colorectal cancer. *Mol Carcinog*, 2014, 53 Suppl 1:E130-9.
71. Finlay GJ. Genetics, molecular biology and colorectal cancer. *Mutat Res*, 1993, 290:3-12.
72. Franci C, Gallen M, Alameda F, Baro T, Iglesias M, Virtanen I, Garcia de Herreros A. Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. *PLoS One*, 2009, 4:e5595.
73. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins

- claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell*, 2008, 19:1912-21.
74. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol*, 1980, 9:227-31.
 75. Gaspar K, Kukova G, Bunemann E, Buhren BA, Sonkoly E, Szollosi AG, Muller A, Savinko T, Lauerma AI, Alenius H, Kemeny L, Dieu-Nosjean MC, Stander S, Fischer JW, Ruzicka T, Zlotnik A, Szegedi A, Homey B. The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J Dermatol Sci*, 2013, 71:12-21.
 76. Gerbe F, Legraverend C, Jay P. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69:2907-17.
 77. Giangreco AA, Vaishnav A, Wagner D, Finelli A, Fleshner N, Van der Kwast T, Vieth R, Nonn L. Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and -125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6:483-94.
 78. Giovannucci E. Cholecalciferol treatment in older patients with isolated systolic hypertension. *JAMA Intern Med*, 2013, 173:1680-1.
 79. Giovannucci E. Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13:11-9.
 80. Giovannucci E. Nutrient biomarkers are not always simple markers of nutrient intake. *Am J Clin Nutr*, 2013, 97:657-9.
 81. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2002, 123:1478-84.
 82. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002, 3:101-28.
 83. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012, 21:309-22.
 84. Harris N. IMMUNOLOGY. The enigmatic tuft cell in immunity. *Science*, 2016, 351:1264-5.
 85. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25:543-59.
 86. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:325-49.
 87. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*, 2013, 92:77-98.
 88. Hawinkels LJ, Paauwe M, Verspaget HW, Wiercinska E, van der Zon JM, van der Ploeg K, Koelink PJ, Lindeman JH, Mesker W, ten Dijke P, Sier CF. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*, 2014, 33:97-107.
 89. Heikkinen S, Väisänen S, Pehkonen P, Seuter S, Benes V, Carlberg C. Nuclear hormone 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39:9181-93.
 90. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 2002, 7:d1356-68.
 91. Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J, Álvarez-Cienfuegos A, Miguel García J, Rodríguez R, Gil B, Ma Jesús C, Ma Jesús L, Ignacio Casal J, García de Herreros A, Bonilla F, Peña C. Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer*, 2014, 134:2984-90.
 92. Herrera A, Herrera M, Peña C. The emerging role of Snail1 in the tumor stroma. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18:872-7.

93. Herrera M HA, Larriba MJ, Ferrer-Mayorga G, García de Herreros A, Bonilla F, Baulida J, Peña C. Colon Cancer-associated Fibroblast Establishment and Culture Growth. *Bio-protocol*, 2016, 6:1773.
94. Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, Gómez I, Soldevilla B, Muñoz C, Provencio M, Campos-Martín Y, García de Herreros A, Casal I, Bonilla F, Peña C. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci*, 2013, 104:437-44.
95. Herrera M, Islam AB, Herrera A, Martín P, García V, Silva J, García JM, Salas C, Casal I, García de Herreros A, Bonilla F, Peña C. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:5914-26.
96. Hidalgo AA, Montecinos VP, Paredes R, Godoy AS, McNerney EM, Tovar H, Pantoja D, Johnson C, Trump D, Onate SA. Biochemical characterization of nuclear receptors for vitamin D3 and glucocorticoids in prostate stroma cell microenvironment. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412:13-9.
97. Hidalgo AA, Paredes R, García VM, Flynn G, Johnson CS, Trump DL, Onate SA. Altered VDR-mediated transcriptional activity in prostate cancer stroma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103:731-6.
98. Hogan SP, Rothenberg ME. Review article: The eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 20:1231-40.
99. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 2007, 357:266-81.
100. Hu H, Sun L, Guo C, Liu Q, Zhou Z, Peng L, Pan J, Yu L, Lou J, Yang Z, Zhao P, Ran Y. Tumor cell-microenvironment interaction models coupled with clinical validation reveal CCL2 and SNCG as two predictors of colorectal cancer hepatic metastasis. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:5485-93.
101. Huerta S, Irwin RW, Heber D, Go VL, Koeffler HP, Uskokovic MR, Harris DM. 1 α ,25-(OH)(2)-D(3) and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apc(min) Mouse. *Cancer Res*, 2002, 62:741-6.
102. Huijbers A, Tollenaar RA, v Pelt GW, Zeestraten EC, Dutton S, McConkey CC, Domingo E, Smit VT, Midgley R, Warren BF, Johnstone EC, Kerr DJ, Mesker WE. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol*, 2013, 24:179-85.
103. Hummel DM, Thiem U, Hobaus J, Mesteri I, Gober L, Stremnitzer C, Graca J, Obermayer-Pietsch B, Kallay E. Prevention of preneoplastic lesions by dietary vitamin D in a mouse model of colorectal carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 136:284-8.
104. International Agency For Research Cancer (IARC). Vitamin D and Cancer. IARC Working Group Reports, Volumen 5. *WHO Press*, 2008, Lyon, Francia.
105. Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer*, 1996, 68:325-32.
106. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 1993, 363:558-61.
107. Isella C, Terrasi A, Bellomo SE, Petti C, Galatola G, Muratore A, Mellano A, Senetta R, Cassenti A, Sonetto C, Inghirami G, Trusolino L, Fekete Z, De Ridder M, Cassoni P, Storme G, Bertotti A, Medico E. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet*, 2015, 47:312-9.
108. Kalayci O, Sonna LA, Woodruff PG, Camargo CA, Jr., Luster AD, Lilly CM. Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma*, 2004, 41:27-33.
109. Kalderen C, Stadler C, Forsgren M, Kvastad L, Johansson E, Sydow-Backman M, Svensson Gelius S. CCL2 mediates anti-fibrotic effects in human fibroblasts independently of CCR2. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20:66-73.

110. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*, 2009, 28:3892-902.
111. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:392-401.
112. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8:387-98.
113. Knower KC, Chand AL, Eriksson N, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Visvader JE, Lindeman GJ, Funder JW, Fuller PJ, Simpson ER, Tilley WD, Leedman PJ, Graham J, Muscat GE, Clarke CL, Clyne CD. Distinct nuclear receptor expression in stroma adjacent to breast tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 142:211-23.
114. Kubeczko M, Nowara E, Karwasiecka D, Siewior G, Czajka-Francuz P, Chudek J, Wojnar J. C-C motif ligand 11 reduction in CLL patients serum after vitamin D supplementation. *Hematology*, 2016, 21:343-50.
115. Kumagai T, O'Kelly J, Said JW, Koeffler HP. Vitamin D2 analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95:896-905.
116. Kure S, Noshio K, Baba Y, Irahara N, Shima K, Ng K, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Vitamin D receptor expression is associated with PIK3CA and KRAS mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18:2765-72.
117. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15:178-96.
118. Larriba MJ, González-Sancho JM, Barbáchano A, Niell N, Ferrer-Mayorga G, Muñoz A. Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 2013, 5:1242-60.
119. Larriba MJ, González-Sancho JM, Bonilla F, Muñoz A. Interaction of vitamin D with membrane-based signaling pathways. *Front Physiol*, 2014, 5:60.
120. Larriba MJ, Martín-Villar E, García JM, Pereira F, Peña C, García de Herreros A, Bonilla F, Muñoz A. Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30:1459-68.
121. Larriba MJ, Muñoz A. SNAIL vs vitamin D receptor expression in colon cancer: therapeutics implications. *Br J Cancer*, 2005, 92:985-9.
122. Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Chicote I, Martín-Fernández G, Puig I, Muñoz A, Pálmer HG. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One*, 2011, 6:e23524.
123. Larriba MJ, Valle N, Pálmer HG, Ordóñez-Morán P, Álvarez-Díaz S, Becker KF, Gamallo C, Gaarcía de Herreros A, González-Sancho JM, Muñoz A. The inhibition of Wnt/ β -catenin signalling by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14:141-51.
124. Lazzeroni M, Serrano D, Pilz S, Gandini S. Vitamin D supplementation and cancer: review of randomized controlled trials. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13:118-25.
125. Le NH, Franken P, Fodde R. Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on β -catenin activation and cancer stemness. *Br J Cancer*, 2008, 98:1886-93.
126. Li F, Zhang A, Shi Y, Ma Y, Du Y. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the differentiation of human lung fibroblasts via microRNA-27b targeting the vitamin D receptor. *Int J Mol Med*, 2015, 36:967-74.
127. Li W, Wang QL, Liu X, Dong SH, Li HX, Li CY, Guo LS, Gao JM, Berger NA, Li L, Ma L, Wu YJ. Combined use of vitamin D3 and metformin exhibits synergistic chemopreventive effects on colorectal neoplasia in rats and mice. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8:139-48.
128. Li Y, Spataro BC, Yang J, Dai C, Liu Y. 1,25-dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int*, 2005, 68:1500-10.

129. Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94:9831-5.
130. Liu G, Hu X, Chakrabarty S. Vitamin D mediates its action in human colon carcinoma cells in a calcium-sensing receptor-dependent manner: downregulates malignant cell behavior and the expression of thymidylate synthase and survivin and promotes cellular sensitivity to 5-FU. *Int J Cancer*, 2010, 126:631-9.
131. Liu J, Chen S, Wang W, Ning BF, Chen F, Shen W, Ding J, Chen W, Xie WF, Zhang X. Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF-beta pathways. *Cancer Lett*, 2016, 379:49-59.
132. Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Qin X, Li S. Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagn Pathol*, 2013, 8:181.
133. Lointier P, Meggouh F, Dechelotte P, Pezet D, Ferrier C, Chipponi J, Saez S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors and human colon adenocarcinoma. *Br J Surg*, 1991, 78:435-9.
134. Lu SL, Zhang WC, Akiyama Y, Nomizu T, Yuasa Y. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res*, 1996, 56:4595-8.
135. Luo Z, Wang Q, Lau WB, Lau B, Xu L, Zhao L, Yang H, Feng M, Xuan Y, Yang Y, Lei L, Wang C, Yi T, Zhao X, Wei Y, Zhou S. Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? *Cancer Lett*, 2016, 377:174-82.
136. Ma Y, Johnson CS, Trump DL. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. *Vitam Horm*, 2016, 100:395-431.
137. Maalmi H, Ordóñez-Mena JM, Schottker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*, 2014, 50:1510-21.
138. Madar S, Brosh R, Buganim Y, Ezra O, Goldstein I, Solomon H, Kogan I, Goldfinger N, Klocker H, Rotter V. Modulated expression of WFDC1 during carcinogenesis and cellular senescence. *Carcinogenesis*, 2009, 30:20-7.
139. Marenholz I, Lovering RC, Heizmann CW. An update of the S100 nomenclature. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763:1282-3.
140. Marisa L, de Reynies A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Flejou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*, 2013, 10:e1001453.
141. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 1995, 268:1336-8.
142. Matusiak D, Murillo G, Carroll RE, Mehta RG, Benya RV. Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1{alpha}-hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14:2370-6.
143. McClellan JL, Davis JM, Steiner JL, Enos RT, Jung SH, Carson JA, Pena MM, Carnevale KA, Berger FG, Murphy EA. Linking tumor-associated macrophages, inflammation, and intestinal tumorigenesis: role of MCP-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303:G1087-95.
144. Meeker S, Seamons A, Paik J, Treuting PM, Brabb T, Grady WM, Maggio-Price L. Increased dietary vitamin D suppresses MAPK signaling, colitis, and colon cancer. *Cancer Res*, 2014, 74:4398-408.
145. Meredith A, Boroomand S, Carthy J, Luo Z, McManus B. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits TGFbeta1-Mediated Primary Human Cardiac Myofibroblast Activation. *PLoS One*, 2015, 10:e0128655.

146. Meyer MB, Goetsch PD, Pike JW. VDR/RXR and TCF4/beta-catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: impact on c-FOS and c-MYC gene expression. *Mol Endocrinol*, 2012, 26:37-51.
147. Milani C, Katayama ML, de Lyra EC, Welsh J, Campos LT, Brentani MM, Maciel Mdo S, Roela RA, del Valle PR, Goes JC, Nonogaki S, Tamura RE, Folgueira MA. Transcriptional effects of 1,25 dihydroxyvitamin D(3) physiological and supra-physiological concentrations in breast cancer organotypic culture. *BMC Cancer*, 2013, 13:119.
148. Milczarek M, Filip-Psurska B, Swietnicki W, Kutner A, Wietrzyk J. Vitamin D analogs combined with 5-fluorouracil in human HT-29 colon cancer treatment. *Oncol Rep*, 2014, 32:491-504.
149. Milczarek M, Psurski M, Kutner A, Wietrzyk J. Vitamin D analogs enhance the anticancer activity of 5-fluorouracil in an in vivo mouse colon cancer model. *BMC Cancer*, 2013, 13:294.
150. Milczarek M, Rosinska S, Psurski M, Maciejewska M, Kutner A, Wietrzyk J. Combined colonic cancer treatment with vitamin D analogs and irinotecan or oxaliplatin. *Anticancer Res*, 2013, 33:433-44.
151. Murillo G, Matusiak D, Benya RV, Mehta RG. Chemopreventive efficacy of 25-hydroxyvitamin D3 in colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103:763-7.
152. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*, 2014, 110:469-78.
153. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW, Jr., de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene*, 2004, 23:7366-77.
154. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3:27-41.
155. Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol*, 1997, 28:1396-407.
156. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52:537-44.
157. Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*, 2014, 211:1503-23.
158. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem*, 2016, 159:151-60.
159. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol*, 1997, 273:F563-74.
160. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 1982, 5:649-55.
161. Ordóñez-Morán P, Álvarez-Díaz S, Valle N, Larriba MJ, Bonilla F, Muñoz A. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on colon cancer cells depend on RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121:355-61.
162. Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Pálmer HG, Valero RA, Barbáchano A, Dunach M, de Herreros AG, Villalobos C, Berciano MT, Lafarga M, Muñoz A. RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. *J Cell Biol*, 2008, 183:697-710.
163. Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Péndas-Franco N, Aguilera Ó, González-Sancho JM, Muñoz A. Vitamin D and cancer: an update of in vitro and in vivo data. *Front Biosci*, 2005, 10:2723-49.
164. Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*, 2009, 8:1675-80.
165. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast

- carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005, 121:335-48.
166. Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*, 2014, 14:306-21.
 167. Osterreicher CH, Penz-Osterreicher M, Grivennikov SI, Guma M, Koltsova EK, Datz C, Sasik R, Hardiman G, Karin M, Brenner DA. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108:308-13.
 168. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19:67-73.
 169. Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, De Jesus-Acosta A, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 2014, 25:719-34.
 170. Padi SK, Zhang Q, Rustum YM, Morrison C, Guo B. MicroRNA-627 mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology*, 2013, 145:437-46.
 171. Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, García de Herreros A, Lafarga M, Muñoz A. Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol*, 2001, 154:369-87.
 172. Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, Ordóñez-Morán P, Peña C, Peiró S, Puig I, Rodríguez R, de la Fuente R, Bernad A, Pollán M, Bonilla F, Gamallo C, García de Herreros A, Muñoz A. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med*, 2004, 10:917-9.
 173. Pálmer HG, Sánchez-Carbayo M, Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Cordón-Cardo C, Muñoz A. Genetic signatures of differentiation induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 2003, 63:7799-806.
 174. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron*, 2010, 3:149-66.
 175. Peña C, García JM, Silva J, García V, Rodríguez R, Alonso I, Millán I, Salas C, García de Herreros A, Muñoz A, Bonilla F. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet*, 2005, 14:3361-70.
 176. Pereira F, Barbáchano A, Silva J, Bonilla F, Campbell MJ, Muñoz A, Larriba MJ. KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet*, 2011, 20:4655-65.
 177. Pereira F, Larriba MJ, Muñoz A. Vitamin D and colon cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19:R51-71.
 178. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 2010, 316:1324-31.
 179. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Rheum Dis Clin North Am*, 2012, 38:13-27.
 180. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*, 2005, 23:609-18.
 181. Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res*, 2003, 63:3819-25.
 182. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow TG, 2nd, Kimball PM, Boohaker EA. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Res*, 1983, 43:2997-3000.

183. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*, 2014, 16:488-94.
184. Pula B, Witkiewicz W, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review. *Int J Oncol*, 2013, 42:1849-57.
185. Qian DZ, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang CY, Myrthue A, Higano CS, Garzotto M, Nelson PS, Beer TM. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate*, 2010, 70:433-42.
186. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 2005, 307:1904-9.
187. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:695-701.
188. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnethi L, Handel AE, Disanto G, Orton SM, Watson CT, Morahan JM, Giovannoni G, Ponting CP, Ebers GC, Knight JC. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res*, 2010, 20:1352-60.
189. Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, Steinmeyer A, Zugel U, Roman J. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 118:142-50.
190. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*, 2010, 316:2713-22.
191. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol*, 2014, 20:18151-64.
192. Refaat B, El-Shemi AG, Kensara OA, Mohamed AM, Idris S, Ahmad J, Khojah A. Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34:71.
193. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, Dekleva EN, Saunders T, Becerra CP, Tattersall IW, Westphalen CB, Kitajewski J, Fernandez-Barrena MG, Fernandez-Zapico ME, Iacobuzio-Donahue C, Olive KP, Stanger BZ. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 2014, 25:735-47.
194. Rincón R, Cristóbal I, Zazo S, Arpi O, Menéndez S, Manso R, Lluch A, Eroles P, Rovira A, Albanell J, García-Foncillas J, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget*, 2015, 6:4299-314.
195. Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113:11-28; quiz 29.
196. Rupp C, Scherzer M, Rudisch A, Unger C, Haslinger C, Schweifer N, Artaker M, Nivarthi H, Moriggl R, Hengstschlager M, Kerjaschki D, Sommergruber W, Dolznig H, Garin-Chesa P. IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction. *Oncogene*, 2015, 34:815-25.
197. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homiczko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*, 2013, 19:619-25.
198. Saito RA, Micke P, Paulsson J, Augsten M, Pena C, Jonsson P, Botling J, Edlund K, Johansson L, Carlsson P, Jirstrom K, Miyazono K, Ostman A. Forkhead box F1 regulates tumor-promoting properties of cancer-associated fibroblasts in lung cancer. *Cancer Res*, 2010, 70:2644-54.
199. Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol*, 2001, 166:7571-8.
200. Salehi-Tabar R, Nguyen-Yamamoto L, Tavera-Mendoza LE, Quail T, Dimitrov V, An BS, Glass L, Goltzman D, White JH. Vitamin D receptor as a master regulator of the c-MYC/MXD1 network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109:18827-32.

201. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*, 1997, 277:2005-7.
202. Samuel GH, Bujor AM, Nakerakanti SS, Hant FN, Trojanowska M. Autocrine transforming growth factor beta signaling regulates extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation via modulation of protein phosphatase 2A expression in scleroderma fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010, 3:25.
203. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20:695-723.
204. Schauer IG, Sood AK, Mok S, Liu J. Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*, 2011, 13:393-405.
205. Schecter AD, Berman AB, Yi L, Ma H, Daly CM, Soejima K, Rollins BJ, Charo IF, Taubman MB. MCP-1-dependent signaling in CCR2(-/-) aortic smooth muscle cells. *J Leukoc Biol*, 2004, 75:1079-85.
206. Schoppmann SF, Jesch B, Riegler MF, Maroske F, Schwameis K, Jomrich G, Birner P. Podoplanin expressing cancer associated fibroblasts are associated with unfavourable prognosis in adenocarcinoma of the esophagus. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30:441-6.
207. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Goktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, Greten FR. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, 2013, 152:25-38.
208. Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, Rizvi I, Rao M, Herrell R, Zinser G, Valrance M, Aranda A, Moras D, Norman A, Welsh J, Byers SW. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell*, 2006, 21:799-809.
209. Sheinin Y, Kaserer K, Wrba F, Wenzl E, Kriwanek S, Peterlik M, Cross HS. In situ mRNA hybridization analysis and immunolocalization of the vitamin D receptor in normal and carcinomatous human colonic mucosa: relation to epidermal growth factor receptor expression. *Virchows Arch*, 2000, 437:501-7.
210. Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3:413-7.
211. Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriack H, Collisson EA, Connor F, Van Dyke T, Kozlov S, Martin P, Tseng TW, Dawson DW, Donahue TR, Masamune A, Shimosegawa T, Apte MV, Wilson JS, Ng B, Lau SL, Gunton JE, Wahl GM, Hunter T, Drebin JA, O'Dwyer PJ, Liddle C, Tuveson DA, Downes M, Evans RM. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*, 2014, 159:80-93.
212. Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98:2640-5.
213. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21:19-25.
214. Shimoda M, Principe S, Jackson HW, Luga V, Fang H, Molyneux SD, Shao YW, Aiken A, Waterhouse PD, Karamboulas C, Hess FM, Ohtsuka T, Okada Y, Ailles L, Ludwig A, Wrana JL, Kislinger T, Khokha R. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. *Nat Cell Biol*, 2014, 16:889-901.
215. Shukla A, Edwards R, Yang Y, Hahn A, Folkers K, Ding J, Padmakumar VC, Cataisson C, Suh KS, Yuspa SH. CLIC4 regulates TGF-beta-dependent myofibroblast differentiation to produce a cancer stroma. *Oncogene*, 2014, 33:842-50.
216. Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M. Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol*, 2005, 58:32-8.

217. Slominski A, Janjetovic Z, Tuckey RC, Nguyen MN, Bhattacharya KG, Wang J, Li W, Jiao Y, Gu W, Brown M, Postlethwaite AE. 20S-hydroxyvitamin D₃, noncalcemic product of CYP11A1 action on vitamin D₃, exhibits potent antifibrogenic activity in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98:E298-303.
218. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, 2005, 21:2067-75.
219. Stange DE, Clevers H. Concise review: the yin and yang of intestinal (cancer) stem cells and their progenitors. *Stem Cells*, 2013, 31:2287-95.
220. Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, Luque T, Pena R, Lluch A, Albanell J, Bonilla F, Rovira A, Pena C, Navajas D, Rojo F, Garcia de Herreros A, Baulida J. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis. *Cancer Res*, 2015, 75:284-95.
221. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*, 1992, 256:668-70.
222. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5:1640-6.
223. Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S. Vitamin D, Cancer Risk, and Mortality. *Adv Food Nutr Res*, 2015, 75:1-52.
224. Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Adachi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene*, 1998, 16:1443-53.
225. Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H. Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 1997, 3:2309-16.
226. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17:3382-93.
227. Tan X, Li Y, Liu Y. Therapeutic role and potential mechanisms of active Vitamin D in renal interstitial fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103:491-6.
228. Tanaka S, Tatsuguchi A, Futagami S, Gudis K, Wada K, Seo T, Mitsui K, Yonezawa M, Nagata K, Fujimori S, Tsukui T, Kishida T, Sakamoto C. Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage cyclooxygenase 2 expression in colonic adenoma. *Gut*, 2006, 55:54-61.
229. Tangpricha V, Spina C, Yao M, Chen TC, Wolfe MM, Holick MF. Vitamin D deficiency enhances the growth of MC-26 colon cancer xenografts in Balb/c mice. *J Nutr*, 2005, 135:2350-4.
230. Tao Q, Wang B, Zheng Y, Jiang X, Pan Z, Ren J. Vitamin D prevents the intestinal fibrosis via induction of vitamin D receptor and inhibition of transforming growth factor-beta1/Smad3 pathway. *Dig Dis Sci*, 2015, 60:868-75.
231. Thorne J, Campbell MJ. The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc*, 2008, 67:115-27.
232. Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol*, 1997, 68:524-30.
233. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol*, 2015, 5:63.
234. Tong WM, Hofer H, Ellinger A, Peterlik M, Cross HS. Mechanism of antimitogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth. *Oncol Res*, 1999, 11:77-84.
235. Toropainen S, Vaisanen S, Heikkinen S, Carlberg C. The down-regulation of the human MYC gene by the nuclear hormone 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ is associated with cycling of corepressors and histone deacetylases. *J Mol Biol*, 2010, 400:284-94.
236. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65:87-108.

237. Torres S, Bartolome RA, Mendes M, Barderas R, Fernandez-Acenero MJ, Pelaez-Garcia A, Pena C, Lopez-Lucendo M, Villar-Vazquez R, de Herreros AG, Bonilla F, Casal JJ. Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:6006-19.
238. Torres S, Garcia-Palmero I, Herrera M, Bartolome RA, Pena C, Fernandez-Acenero MJ, Padilla G, Pelaez-Garcia A, Lopez-Lucendo M, Rodriguez-Merlo R, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Casal JJ. LOXL2 Is Highly Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts and Associates to Poor Colon Cancer Survival. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:4892-902.
239. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 97:103-9.
240. Tsai YC, Weissman AM. Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. *FEBS Lett*, 2011, 585:3166-73.
241. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:2082-90.
242. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2014, 25 Suppl 3:iii1-9.
243. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 2002, 111:241-50.
244. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71:241-60.
245. van Es JH, Clevers H. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends Mol Med*, 2005, 11:496-502.
246. Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues. *Cancer Lett*, 1994, 86:67-73.
247. Vanoirbeek E, Eelen G, Verlinden L, Carmeliet G, Mathieu C, Bouillon R, O'Connor R, Xiao G, Verstuyf A. PDLIM2 expression is driven by vitamin D and is involved in the pro-adhesion, and anti-migration and -invasion activity of vitamin D. *Oncogene*, 2014, 33:1904-11.
248. Veldurthy V, Wei R, Campbell M, Lupicki K, Dhawan P, Christakos S. 25-Hydroxyvitamin D3 24-Hydroxylase: A Key Regulator of 1,25(OH)2D3 Catabolism and Calcium Homeostasis. *Vitam Horm*, 2016, 100:137-50.
249. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 2010, 12:468-76.
250. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int*, 2010, 78:140-5.
251. Wagsater D, Lofgren S, Hugander A, Dienus O, Dimberg J. Analysis of single nucleotide polymorphism in the promoter and protein expression of the chemokine eotaxin-1 in colorectal cancer patients. *World J Surg Oncol*, 2007, 5:84.
252. Wang LF, Chien CY, Tai CF, Chiang FY, Chen JY. Vitamin D decreases the secretion of eotaxin and RANTES in nasal polyp fibroblasts derived from Taiwanese patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31:63-9.
253. Wang W, Liu H, Dai X, Fang S, Wang X, Zhang Y, Yao H, Zhang X, Chao J. p53/PUMA expression in human pulmonary fibroblasts mediates cell activation and migration in silicosis. *Sci Rep*, 2015, 5:16900.
254. Wang Y, DeLuca HF. Is the vitamin d receptor found in muscle? *Endocrinology*, 2011, 152:354-63.

255. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*, 2012, 523:123-33.
256. Winkler C, Witte L, Moraw N, Faulenbach C, Muller M, Holz O, Schaumann F, Hohlfield JM. Impact of endobronchial allergen provocation on macrophage phenotype in asthmatics. *BMC Immunol*, 2014, 15:12.
257. Wood RJ, Tchack L, Angelo G, Pratt RE, Sonna LA. DNA microarray analysis of vitamin D-induced gene expression in a human colon carcinoma cell line. *Physiol Genomics*, 2004, 17:122-9.
258. Wu Q, Yang Y, Wu S, Li W, Zhang N, Dong X, Ou Y. Evaluation of the correlation of KAI1/CD82, CD44, MMP7 and beta-catenin in the prediction of prognosis and metastasis in colorectal carcinoma. *Diagn Pathol*, 2015, 10:176.
259. Xia Y, Entman ML, Wang Y. CCR2 regulates the uptake of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis. *PLoS One*, 2013, 8:e77493.
260. Xiong M, Gong J, Liu Y, Xiang R, Tan X. Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303:F1107-15.
261. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, Kondo C, Mizota A, Utsunomiya S, Muro K, Yatabe Y. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2011, 104:856-62.
262. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, Beyer C, Dees C, Gela K, Distler O, Schett G, Distler JH. Vitamin D receptor regulates TGF-beta signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74:e20.
263. Zgaga L, Theodoratou E, Farrington SM, Din FV, Ooi LY, Glodzik D, Johnston S, Tenesa A, Campbell H, Dunlop MG. Plasma vitamin D concentration influences survival outcome after a diagnosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2014, 32:2430-9.
264. Zhang GY, Cheng T, Luan Q, Liao T, Nie CL, Zheng X, Xie XG, Gao WY. Vitamin D: a novel therapeutic approach for keloid, an in vitro analysis. *Br J Dermatol*, 2011, 164:729-37.
265. Zhang J, Chen L, Xiao M, Wang C, Qin Z. FSP1+ fibroblasts promote skin carcinogenesis by maintaining MCP-1-mediated macrophage infiltration and chronic inflammation. *Am J Pathol*, 2011, 178:382-90.
266. Zhang K, Grither WR, Van Hove S, Biswas H, Ponik SM, Eliceiri KW, Keely PJ, Longmore GD. Mechanical signals regulate and activate SNAIL1 protein to control the fibrogenic response of cancer-associated fibroblasts. *J Cell Sci*, 2016, 129:1989-2002.
267. Zheng W, Wong KE, Zhang Z, Dougherty U, Mustafi R, Kong J, Deb DK, Zheng H, Bissonnette M, Li YC. Inactivation of the vitamin D receptor in APC(min/+) mice reveals a critical role for the vitamin D receptor in intestinal tumor growth. *Int J Cancer*, 2012, 130:10-9.
268. Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9:40-55.
269. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*, 2007, 115:654-7.

Parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en el siguiente artículo:

Gemma Ferrer-Mayorga, Gonzálo Gómez-López , Antonio Barbáchano, Asunción Fernández-Barral, Cristina Peña, David G. Pisano, Ramón Cantero, Federico Rojo, Alberto Muñoz, María Jesús Larriba. "Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer". *Gut* 2016; in press, doi: 10.1136/gutjnl-2015-310977.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han publicado una serie de trabajos:

Silvia Alvarez-Díaz , Noelia Valle , **Gemma Ferrer-Mayorga** , Luís Lombardía , Mercedes Herrera , Orlando Domínguez , Miguel F. Segura , Felix Bonilla , Eva Hernando , Alberto Muñoz .

"MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells".

Human Molecular Genetics 2012; May 15;21(10):2157-65.

María Jesús Larriba, José Manuel González-Sancho, Antonio Barbáchano, Núria Niell, **Gemma Ferrer-Mayorga**, Alberto Muñoz.

"Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer Cells".

Cancers (Basel) 2013; Oct 21;5(4):1242-60.

Gemma Ferrer-Mayorga, Silvia Alvarez-Díaz, Noelia Valle, Javier De Las Rivas, Marta Mendes , Rodrigo Barderas, Francesc Canals, Olga Tapia, Ignacio J. Casal, Miguel Lafarga, Alberto Muñoz.

"Cystatin D locates in the nucleus at sites of active transcription and modulates gene and protein expression".

Journal of Biological Chemistry 2015; Oct 30;290(44):26533-48.

Antonio Barbáchano, Asunción Fernández-Barral, **Gemma Ferrer-Mayorga**, María Jesús Larriba, Alberto Muñoz.

"The endocrine vitamin D system in the gut"

Molecular and Cellular Endocrinology (Enviado)

Núria Niell, Isabel Sánchez-Pérez, María Jesús Larriba, **Gemma Ferrer-Mayorga**, Luis del Peso, Alberto Muñoz, José Manuel González-Sancho.

"The human PKP2/Plakophilin-2 gene is induced by Wnt/ β -catenin in normal and colon cancer-associated fibroblasts"

(Enviado)